

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Steroidhormoonide mõju geeniekspressioonile endomeetriumi stroomarakkudes
polütsüstilise munasarja sündroomiga patsientidel**

Bakalaureusetöö

12EAP

Merili Peltser

Juhendajad: MSc Marina Suhorutšenko

MSc Indrek Teino

TARTU 2018

INFOLEHT

Steroidhormoonide mõju geeniekspressioonile endomeetriumi stroomarakkudes polütsüstilise munasarja sündroomiga patsientidel

Käesolev töö annab põgusa ülevaate reproduktiivsüsteemist ja põhjalikuma ülevaate polütsüstilise munasarja sündroomist. Kirjeldatakse hormoonide mõju munasarjas ja endomeetriumis. Tuuakse välja peamised sümptomid ja oletatavad põhjused, mis osalevad sündroomi kujunemisel. Eksperimentaalses osas on vaadeldud steroidhormoonide esmast vastust endomeetriumi strooma fibroblasti rakkudes. Täpsemalt on uuritud, kuidas östrogeen, progesteron ja testosteroon mõjutavad geeniregulatsiooni PCOS patsientidel ning võrreldud neid kontrollrühmaga.

Märksõnad: polütsüstiline munasarja sündroom, PCOS, steroidhormoonid, endomeetriumi stroomarakud, geeniekspressioon

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

Effects of steroid hormones on gene expression in endometrial stromal cells in patients of polycystic ovary syndrome

This thesis provides a brief insight into female reproductive system and a thorough overview on polycystic ovary syndrome (PCOS). It describes the impact of sex hormones on ovary and endometrium. Main symptoms and putative mechanism that participate in the development of PCOS are pointed out. In the experimental part the early response to steroid hormones is evaluated in cultured endometrial stromal fibroblasts. It is investigated how estrogen, progesterone and testosterone treatment affects gene expression of specific genes in patients with PCOS compared to control group.

Keywords: polycystic ovary syndrome, PCOS, steroid hormones, endometrial stromal cells, gene expression

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Naise reproduktiivsüsteem.....	8
1.1.1 Munasarja morfoloogia ja oogenees	8
1.1.2 Endomeetriumi morfoloogia ja retseptiivsus	9
1.2 Steroidhormoonid	10
1.3 Polütsüstilise munasarja sündroom.....	12
1.3.1 Polütsüstilise munasarja sündroomi sümptomid ja diagnoosimine	12
1.3.2 Polütsüstilise munasarja sündroomiga seotud viljatuse põhjused.....	13
1.3.3 Polütsüstilise munasarja sündroomi ravi.....	16
1.3.4 Polütsüstilise munasarja sündroomi geneetilised uuringud	16
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjal ja metoodika	18
2.2.1 Rakkude kogumine ja kasvatamine.....	18
2.2.2 RNA eraldamine.....	20
2.2.3 Komplementaarse DNA sünteesimine	20
2.2.4 Geenide ja nende praimerite valik.....	21
2.2.5 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ehk qPCR.....	23
2.2.6 Andmete statistiline analüüs.....	23
2.2.7 Ühe rakurakupopulisatsiooni spetsiifiline RNA sekveneerimise meetod	23
2.3 Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1 Töötlus östrogeeniga	24
2.3.2 Töötlus progesterooniga.....	25
2.3.3 Töötlus dihüdrotestosterooniga	26
2.3.4 Metabolismigeenid	28

2.3.5 Polütsüstilise munasarja sündroomi markergeenid	29
2.3.6 Koekultuuris kasvatatud rakkude võrdlus biopsia rakkudega.....	30
2.3.7 Töö järelused, kitsaskohad ja tulevikuplaanid	31
KOKKUVÕTE	33
SUMMARY	34
TÄNUSÕNAD	35
KIRJANDUSE LOETELU.....	36
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	41
LISAD	42
Lisa 1.....	42
Lisa 2.....	43
LIHTLITSENTS.....	44

KASUTATUD LÜHENDID

AES – Hüperandrogenismi ühing (*Androgen Excess Society*)

AMH – Anti-Mülleri hormoon

ASRM – Ameerika reproduktiivmeditsiini ühing (*American Society for Reproductive Medicine*)

cAMP – Tsükliline adenosiinmonofosfaat (*cyclic adenosine monophosphate*)

Ct – lävitsükkel (*cycle threshold*)

DHT – dihüdrotestosteroon

E1 – östroon

E2 – östradiool

E3 – östriool

ES – eelsekretoorne (*early-secretory*)

ESHRE – Euroopa Inimese Reproduktiooni ja Embrüoloogia Ühing (*European Society for Human Reproduction and Embryology*)

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon

GnRH – gonadotropiini vabastav hormoon (*Gonadotropin-releasing hormone*)

HESCs – inimese endomeetriumi stooma rakud (*human endometrial stromal cells*)

HK – koduhoidja geen (*housekeeping gene*)

HPO – hüpotalamus-hüpofüüs-munasarjad (*hypothalamic-pituitary-ovarian*)

IVF – *in vitro* viljastamine (*in vitro fertilization*)

KMI – kehamassiindeks

LH – luteiniseeriv hormoon

MAPK – mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas (*mitogen-activated protein kinase*)

MS – kesksekretoorne (*mid-secretory*)

NIH – USA riiklik tervishoiu instituut (*National Institutes of Health*)

P4 – progesteroon

PCOS – Polütsüstilise munasarja sündroom (*Polycystic ovary syndrome*)

RHK-10 – Rahvusvaheline Haiguste Klassifikatsioon, 10. versioon

RNA-seq – RNA sekveneerimine

RT-qPCR – Kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni PCR

S-FBS – dekstaaniga töödeldud veise loote seerum (*Charcoal-dextran treatment of fetal bovine serum*)

STRT – ühe raku põhine pöördtranskriptsioon (*single-cell tagged reverse transcription*)

T – testosteroon

TNF – kasvaja nekroosifaktor (*tumor necrosis factor*)

VEH – taustlahus (*vehicle*)

SISSEJUHATUS

Polütsüstilise munasarja sündroom (PCOS) on endokriinne häire, mida esineb 5-20 protsendil reproduktiivses eas olevatel naistel. PCOS-i peamisteks tunnusteks on kõrge androgeeni tase veres, ovulatsioonihäired ja munasarjade polütsüstilisus. Ligi 40 protsenti PCOS-i kandjatest on viljatud. Kuigi viljatus ei kujuta ohtu füüsilisele tervisele, on see vaimselt kurnav. PCOS diagnoosiga naistel on ka kõrgem risk raseduse komplikatsioonideks kui tervetel naistel.

Tänini pole selge, mis on polütsüstilise munasarja sündroomi tekke põhjustajaks. Selle uurimiseks on tehtud palju ülegenoomseid uuringuid. On uuritud nii hormoonide taset kui ka ovulatsioonihäireid põhjustavaid mehhanisme. PCOS patsientidel on mitmeid kõrvalekaldeid endomeetriumi funktsioonides, kuid seda on veel vähe uuritud.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kuidas östrogeen, progesteron ja testosteroon reguleerivad geeniekspressiooni endomeetriumi strooma rakkudes, kasutades selleks RT-qPCR meetodit ning seejärel võrrelda geeniekspressiooni tervetel ja PCOS-i patsientidel. Kolmandaks võrreldi söötmel kasvatatud rakkude geeniekspressiooni stroomast eraldatud rakkude geeniekspressiooniga.

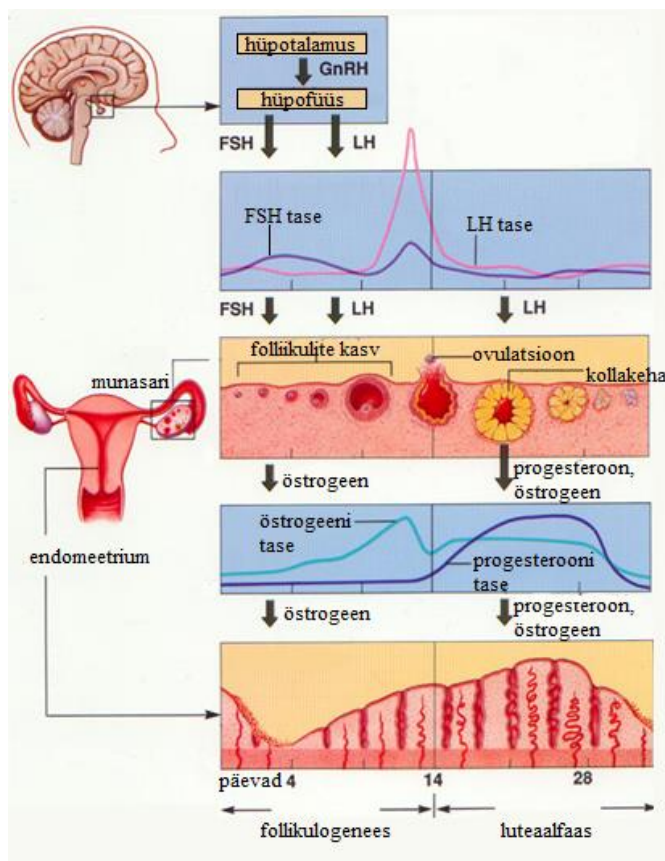
Töö teostati Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuses koostöös Oulu ülikooliga Soomes. Antud uurimustöö on osa pilootuuringust. Rakkude kogumine ja nende hormoonidega töötlemine toimus Oulu ülikoolis ning autori eksperimentaalne osa algas RNA eraldamisest rakulüsaadist.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Naise reproduktiivsüsteem

1.1.1 Munasarja morfoloogia ja oogenees

Munasari on reproduktiivsüsteemi üks tähtsamaid organeid, kuna seal toimub ootsüütide küpsemine. Munasarja ehitust saab kirjeldada kihiti, väljastpoolt sissepoole järgnevad üksteisele: ühekihiline kuupepiteel, valkjaskest, munasarjakoor ja munasarjasäsi. Oogenees toimub munasarja koores. Puberteedieas on primaarseid ootsüüte u 20 000, kuid lõplikult areneb neist välja keskmiselt 400. Ootsüüdi küpsemine ehk follikulogenees toimub järgmiselt: primaarne ootsüüt → primordiaalfolliikul → primaarfolliikul → sekundaarfolliikul → tertsiaarfolliikul → põisfolliikul e Graafi folliikul. Graafi folliikul on lõppastmeks esimesel küpsemisjagunemisel ja algab ovulatsioon. Ovulatsioon on munaraku vabanemine munasarjast ning antud protsess on reeglipäraselt väga täpne: 28-päevase menstruaaltsükli puhul toimub see 14. päeval (kuni 2 päevase eksimusega). (Lepp, 2012)



Joonis 1. Menstruaaltsükli ajal toimuvad hormonaalsed muutused. (Palmer, 2013)

Reproduktiivsüsteemi normaalne areng ja talitus sõltub steroidsetest suguhormoonidest, mis on reguleeritud hüpotalamus-hüpofüüs-munasarja (HPO) teljega (Joonis 1). Hüpotalamus produtseerib ja sekreteerib gonadotropiini vabastavat hormooni (GnRH), mis seondub ajuripatsis ehk hüpofüüsis. See vabastab biokeemilise ahela, mille haripunktiks on luteiniseeriva hormooni (LH) ja folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) tootmine hüpofüüsis.

FSH stimuleerib munasarjas ootsüütide meioosi, ootsüüdi ümber tekib rakkude kiht, mis moodustab folliikuli. Folliikulrakkude ülesandeks on östrogeni tootmine – madal östrogeni tase inhibeerib FSH sekretsiooni negatiivse tagasiside kaudu, kõrge östrogeni tase aga stimuleerib äkilise FSH ja LH taseme tõusu, vallandades ovulatsiooni – munarakk eraldub folliikulist ja viimastest kujuneb välja kollakeha. (Tamm et al., 2011; Nienstedt et al., 2011)

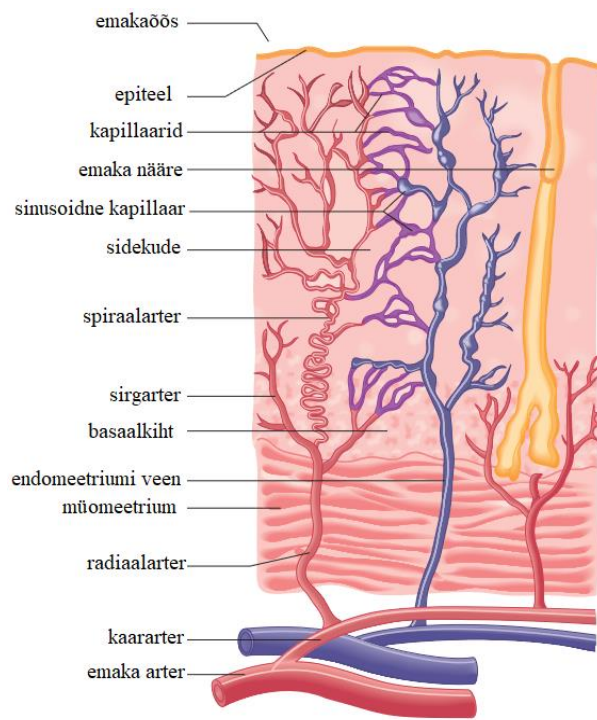
Ovulatsioon käivitab menstruaaltsükli luteaalfaasi, kus endomeetrium küpseb ja valmistub embrüo vastuvõtuks. Endomeetriumi kasvu stimuleerib progesteron ja östrogen, mida toodab kollaskeha. Progesteron annab omakorda negatiivset tagasisidet hüpotalamusele, mille tulemusel GnRH sekretsioon inhibeeritakse ja ei sünteesita ka FSH-d ja LH-d ning seega ei käivitata ka uut meioosi munasarjas. Kui viljastumist ei toimu, siis kollaskeha taandareneb ja ei sünteesita enam progesteroni ja östrogeni. Ilma progesteronita algab menstruatsioon ja uus tsükkel. (Tamm et al., 2011; Nienstedt et al., 2011)

1.1.2 Endomeetriumi morfoloogia ja retseptiivsus

Emakas on lihaseline õõneselund, mille kõige sisemist kihti nimetatakse endomeetriumiks ehk limaskestaks. Emakaõõne limaskest on sile ja näärmete tõttu paks ja kahekihiline – pindmisel poolel on ühekihiline silinderepiteel ja selle all sidekude (Joonis 2). (Lepp, 2012) Fertiilses eas naistel jaguneb endomeetrium funktsionaalselt kaheks kihiks: basaalkihiks ja funktsionaalkihiks. Basaalkiht on aluseks funktsionaalkihi regeneratsioonile. Viimane on aga mõjutatud hormoonidest ja allub igakuistele tsüklilistele muutustele (proliferatsioon, sekretsioon, nekroos ja irdumine). Funktsionaalkihi koosseisu kuuluvad spiraalarterid, mis kasvavad igakuiselt vastavalt tsüklile ja nad näitavad endomeetriumi küpsust. (Männik, 2010)

Endomeetriumi retseptiivsus on emaka suutlikkus vastu võtta embrüot. Implantatsioon on keeruline ja mitmeid tegureid ühendav protsess. Õnnestunud implantatsioon vajab tervet embrüot, retseptiivset endomeetriumi, sünkroniseeritud ja edukat molekulaarset kooskõla ema immuunsüsteemiga.

Endomeetriumi tsükli võib jagada kolmeks osaks: proliferatsioonifaas (vastab follikulaarfaasile munasarjas), sekretsioonifaas (vastab luteaalfaasile munasarjas) ja menstruatsioonifaas. Sekretoorne faas on defineeritud kui aeg ovulatsiooni ja menstruatsiooni vahel. Kui implantatsiooni ei toimu, siis kasvanud limaskest nekrotiseerub ja irdub menstruatsiooni ajal. (Ruiz-Alonso et al., 2012)

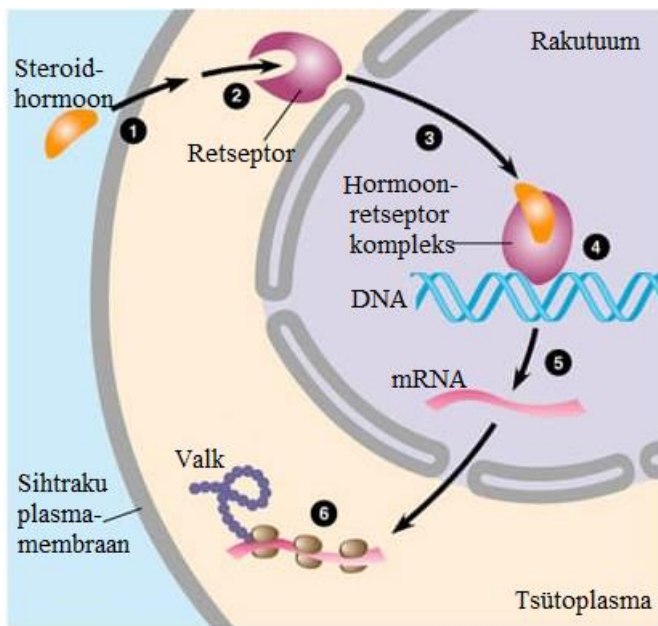


Joonis 2. Läbilõige endomeetriumi koest (Cunningham et al., 2010)

Proliferatsioonifaas on kontrollitud östrogeeniga ning sel ajal toimub strooma rakkude, näärmete ja spiraalarterite kasv. Pärast ovulatsiooni tõuseb progesterooni tase, mis toob endaga kaasa sekretoorsed muutused, läbi mille endomeetrium omandab retseptiivsuse, võimaldades blastotsüsti implantatsiooni – see periood on ka tuntud kui implantatsiooniaken. Implantatsiooniaken „avaneb“ 19. või 20. menstruaaltsükli päeval ja seda neljaks kuni viieks päevaks, kuniks progesteroon jõuab enda maksimaalse kontsentratsioonini. Retseptiivsuse faasis läbib endomeetrium morfoloogilised, biokeemilised ja geneetilised muutused, et saada funktsionaalselt kompetentseks. (Mahajan, 2015) Siiani pole teada täpseid mehhanisme, kuidas endomeetrium retseptiivseks muutub, kuid üks olulisim protsess on detsidualisatsioon. Detsidualisatsiooni käigus läbivad endomeetriumi strooma fibroblasti rakud nii morfoloogilisi kui ka funktsionaalseid muutusi, spetsialiseerudes sekretoorseteks rakkudeks, mis tagavad energia ja immuuntolerantsuse, mis on vajalik embrüo implantatsiooniks ja platsenta arenguks. Antud protsess on juhitud progesterooni taseme ja lokaalse tsüklilise adenosinmonofosfaadi (cAMP) produktsiooniga. (Gellersen ja Brosens, 2014)

1.2 Steroidhormoonid

Steroidhormoonid on rasvlahustuvad kolesterooli derivaadid. Hormoone sünteesitakse neerupealisekoores, sugunäärmetes ja platsentas. Nad läbivad tänu lipiidsele struktuurile kergesti rakumembraani ning mõjutavad raku tuuma (Joonis 3).



Joonis 3. Hormooni toime rakus. Steroidhormoon läbib sihttraku plasmamembraani (1), hormoon kinnitub retseptorile ning moodustub hormoon-retseptor kompleks (2). Kompleks liigub tuuma (3) ja seondub DNA-ga (4). DNA pealt sünteesitakse vastav mRNA (5), millelt sünteesitakse valk (6). (Addison Wesley Longman, Inc, 1999)

Steroidhormoonide alla kuuluvad androgeenid, östrogeenid, progestiinid, glükokortikoidid ja mineralokortikoidid (Nienstedt et al., 2011). Östradiol (E2) on östrogeenide hulka kuuluv suguhormoon. Östrogeenide alla kuulub veel östroon (E1) ja östriool (E3) aga östradiol on neist kolmest kõige bioaktiivsem. Östradioli sünteesitakse reproduktiivses naistel peamiselt munasarja granuloosarakkudes. Lisaks toodab seda kollaskeha, platsenta ja neerupealisekoor, aromatiseerides sünteesitud androgeene (nt testosteroon). Eeskätt E2 toimel formeerub menstruaaltsükkel (lisaks arenevad suguelundid ja kujunevad sekundaarsed sugutunnused). E2 ja progesterooni koostöös toimub emaka ettevalmistus implantatsiooniks ja need on vajalikud raseduse püsimiseks. Kui E2 on vähe, siis võivad esineda menstruaaltsükli häired ja viljatus. (Nienstedt et al., 2011)

Progesteron (P4) on progestiinide hulka kuuluv hormoon, mida toodab kollaskeha. P4 kutsub esile sekretsioonifaasi, põhjustab munajuhade limaskesta paksenemist ja erituse suurenemist. (Nienstedt et al., 2011) P4 taseme langus viitab platsentaarsele puudulikkusele ja võib viia iseenesliku abordini.

Dihüdrotestosteroon (DHT) kuulub androgeenide hulka ning on konverteeritud testosteroonist. Naistel sünteesitakse androgeene peamiselt neerupealistes ja munasarjades. Testosterooni sünteesitakse ka kollakehas, mis moodustub ovulatsiooni käigus. Androgeene vajatakse varajases etapis folliikulite arenguks ja östrogeeni produktsiooniks. (Lebbe ja Woodruff, 2013)

1.3 Polütsüstilise munasarja sündroom

Polütsüstilise munasarja sündroom (PCOS; RHK-10 diagnoosi kood E28.2) on endokriinne häire, mille tunnusteks on hüperandrogenism ning ovulatsioonihäired ilma muu teadaoleva haiguseta. Esimesena kirjeldasid seda haigusnähtu Stein ja Leventhal aastal 1935 (Stein ja Leventhal, 1935) ning sellest tulenevalt nimetatakse seda ka Stein-Leventhali tõveks. PCOS esineb 5-20% reproduktiivses eas naistel. Tihtipeale avastatakse probleem just viljatuse uuringute käigus. (Azziz et al., 2016; Knochenhauer et al., 1998; de Melo et al., 2017)

Naiste reproduktiivsüsteemi väärtalitus on tänapäeval aina kasvav mure. Viljatus mõjutab keskmiselt 15% paaridest. Kuigi viljatus ei kujuta ohtu füüsilisele tervisele, on see vaimset kurnav. Viljatus on paari võimetus rasestuda ja kanda rasedus lõpuni aasta jooksul, samal ajal hoidudes rasestumisvastastest vahenditest. (Agarwal et al., 2015) Eesti naiste tervise uuringu järgi esineb viljatust 20-44-aastaste naiste seas 20,2% (Sildnik, 2017).

Naisepoolset viljatust põhjustavad sagedased põletikud, erinevad patoloogiad nagu näiteks infektsioonijärgne munajuha kahjustus, endometrioos ja emaka anomaaliad (Abrao et al., 2013), endokriinsed häired (siia alla kuulub PCOS), autoimmuunhaigused ja ebatervislik elustiil (suitsetamine, alkohol, narkootikumid, halb toitumine jne) (The ESHRE Capri Workshop Group, 2002). Alati ei suudeta määrata põhjust viljatusele, sellisel juhul nimetatakse seda idiopaatiliseks viljatuseks.

1.3.1 Polütsüstilise munasarja sündroomi sümptomid ja diagnoosimine

Pole täpselt teada, mis põhjustab polütsüstilise munasarja sündroomi, kuid arvatavasti on sellel nii geneetilised kui ka keskkonnast sõltuvad põhjused (Azziz, 2017). Patsientidel on mitmeid erinevaid sümptomeid, kuid kõiki tunnuseid ei pruugi esineda igal haiguse kandjal, seetõttu ei saa seisundit üheselt määratleda (Ehrmann, 2005). PCOS diagnoosimise kriteeriumid on aja jooksul veidi varieerunud. Enamasti kaalutletakse kolme tunnuse vahel – androgenism, munasarja väärtalitus ja polütsüstilised munasarjad. Kuigi viimane kriteerium diagnoosimiseks anti välja aastal 2009 (*Androgen Excess and PCOS Society*), on enamlevinud juhend PCOS-i määramiseks 2003. aastal kinnitatud Rotterdami definitsioon. Ka Eestis määratakse PCOS-i nende kriteeriumite järgi (Haldre, 2014). Rotterdami konsensuskriteerium nõuab kahte sümptomit kolmest: (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004)

1. oligomenorröa/ anovulatsioon
2. kliiniline ja/ või biokeemiline hüperandrogenism

3. palju tsüste munasarjas (ultraheliuuringul ühes munasarjas vähemalt 12 folliikulit läbimõõduga 2–9 mm)

Siinkohal võib välja tuua, et kuigi nimetus on polütsüstilise munasarja sündroom, siis polütsüstiliste munasarjade olemasolu ei määra üksi diagnoosi ja ka vastupidi, PCOS võib olla inimesel, kellel pole munasarjade polütsüstilisust.

Kuigi diagnoosiks on vaja kahte sümptomit kolmest, on PCOS patsientidel palju erinevaid sümptomeid (Ehrmann, 2005; Bremer, 2010):

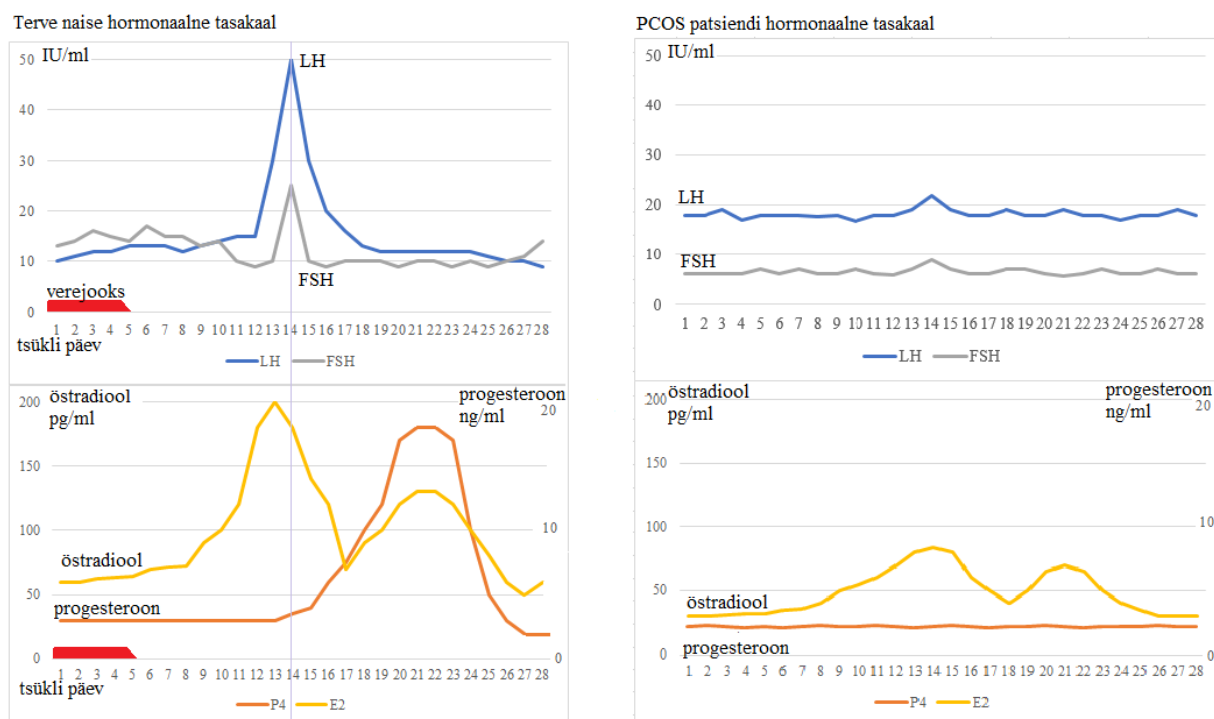
1. Menstruaaltsükli häired
 - a. Menstruatsiooni puudumine (vähemalt 6 kuud) ehk amenorröa
 - b. Sagedased menstruatsiooni vahele jäämised ehk oligomenorröa
 - c. Väga tugeva voolusega menstruatsioon
 - d. Ovulatsiooni puudumine ehk anovulatsioon
2. Rasvumus – kaalus juurde võtmine, või ka raskus kehakaalu kaotada, eriti puusade ümber.
3. Viljatus – paljud PCOS patsiendid on viljatud ning selle põhjustab peamiselt anovulatsioon, kuid see pole ainuke põhjus.
4. Hüperandrogenismist tulenevad tunnused: akne, hirsutism ehk liigne karvakasv, kiilanemine
5. Rasune nahk
6. Vaagnavalu

1.3.2 Polütsüstilise munasarja sündroomiga seotud viljatuse põhjused

PCOS-i ja viljatuse vahel on tugev seos – ligi 40% patsientidest on viljatud (Teede et al., 2010). Viljatust põhjustavaid tegureid on erinevaid, üheks neist on häired hormonaalses tasakaalus. Hormoonide taset mõjutavad näiteks endokriinsed näärmed (kilpnääre, neerupealised, pankreas) ja ka mitte-endokriinsed organid (maks, neerud). Need mitte-endokriinsed organid on seotud reproduktiivsete hormoonide metabolismiga – kui nende funktsioon on taandarenenud, siis HPO regulatsiooniteljetagasiside mehhanismid on häirunud, mille tulemuseks on ootsüüdi küpsemise düsregulatsioon, ovulatsiooni häirumine ja viimaks viljatus. Anovulatsioon on sümptom, mis näitab endokriinset või metaboolset ebanormaalset talitlust, mille tagajärjeks võivad olla menstruatsioonihäired ja viljatus, kuid anovulatsioon pole diagnoos või haigus ise. (Luciano et al., 2013)

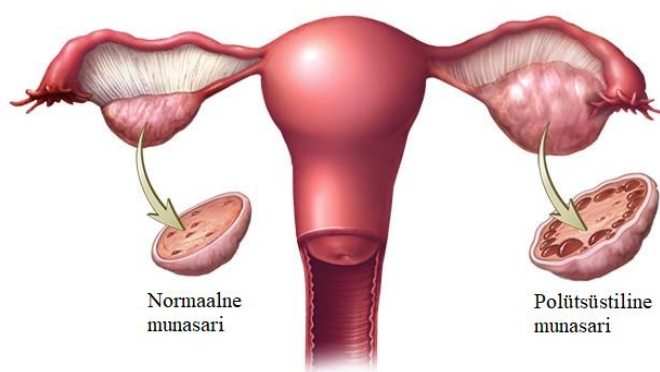
Polütsüstilise munasarja sündroomi puhul on organismis tavapärasest rohkem luteiniseerivat hormooni (LH), testosterooni ja Anti-Mülleri hormooni (AMH). Vähem produtseeritakse aga

folliikuleid stimuleerivat hormooni (FSH), östradiooli ja progesterooni. (Pigny et al., 2006)
Enamik neist on reguleeritud HPO teljega (Joonis 1).



Joonis 4. Terve versus PCOS patsiendi hormonaalne tasakaal. Erinevalt tervetest, PCOS patsientidel ei teki LH, FSH ja progesterooni taseme tõusu, ka östradiooli tase on madalam. (kohandatud Nienstedt et al., 2011; Sterling, 2011)

Kui hormonaalne tasakaal pole paigas, on munarakkude küpsemine ja vabanemine häiritud (Joonis 4). Normaalolukorras LH taseme tõus käivitab ovulatsiooni. Kõrge androgeenide tase aga pärsib LH tootmist ja munarakud küll küpsevad ja suurenevad, kuid ei vabane ja jäävad munasarja. Igal järgmisel kuul toimub tsükkel samamoodi ning tekivad polütsüstilised munasarjad (Joonis 5). Munasarjades kuhjunud lõpuni küpsemata munarakud moodustavadki tsüste. (Hopkinson et al., 1998)



Joonis 5. Polütsüstilise ja normaalse munasarja võrdlus. Kui ovulatsiooni ei toimu, siis munarakud kuhjuvad munasarja ning tekib polütsüstiline munasari. Mayo Foundation for Medical Education and Research (mayoclinic.org)

Munaraku vabanemisel moodustub kollaskeha, mis vastutab P4 tootmise eest, mis omakorda vastutab endomeetriumi kasvamise ja arengu eest. See hormoon on kriitiliselt oluline detsidualisatsioonil, implantatsioonil ja raseduse püsimiseks. PCOS patsientidel aga HPO telje hormonaalregulatsiooni häiringu tõttu ovulatsiooni ei toimu, mis tähendab, et ei teki ka kollaskeha ega sellest tulenevalt ei toodeta ka vajalikus koguses P4, olgugi et väike kogus P4 on organismis olemas, sest seda toodetakse ka neerupealistes. P4 puudulikkusest tekib amenorröa, mis on üks PCOS sümptom. (Wetendorf and DeMayo, 2012) PCOS patsientidel on täheldatud ka P4 tundlikkuse vähenemist ja resistentsust, mida hüpoteetiliselt põhjustab vähene P4 tase emakas. Seda teooriat toetab ka varasem geeniekspressioonianalüüs. (Savaris et al., 2011) Progesteron-resistentsel emakal võib esineda hüperplaasiat ja kartsinoomi (Li et al., 2014).

Endomeetriumi areng ja talitus on peamiselt kontrollitud östrogeeni ja progesterooniga. Ebatäiuslik steroidhormoonide talitus põhjustab ka emaka limaskestakoe ebapiisavat küpsemist ja kui emakas pole retseptiivne, siis viljastumist ei toimu. (Mehdinejadani et al., 2018; Tepekoy et al., 2015)

Endomeetriumi proliferatsiooni mõjutab östrogeen, mis toimib läbi Wnt signaaliraja. Wnt raja funktsiooni munasarjas pole veel kirjeldatud. On tõendeid, et teatud Wnt raja geenid pärivad testosterooni sünteesi neerupealise kooses, seega on võimalik, et Wnt glükoproteiinid osalevad ka munasarja hormoonide tootmises. Wnt antagonist *DKKI* on ülesreguleeritud ja Wnt ligand on alla reguleeritud teeka rakkudes PCOS patsientidel, mis osutab, et Wnt signaalirada on PCOS puhul pärsitud teeka ja/või granuloosa rakkudes. Seega antud hüpoteesi kohaselt võivad häired Wnt rajas tekitada polütsüstilise munasarja fenotüüpi, kuigi see vajab veel täiendavaid uuringuid. (Wood et al., 2004)

Üheks viljatust põhjustavaks faktoriks on rasvumus. Ülekaalulisus toob endaga kaasa hüpotalamuse-hüpofüüsi-munasarjade (HPO) regulatsioonitelg häirumise, ootsüütide kvaliteedi ja endomeetriumi retseptiivsuse halvenemise. Rasvade ainevahetusel on tugev mõju suguhormoonide sekretsioonile ja metabolismile, tulemuseks on muutused östrogeeni ja androgeeni kättesaadavuses. Kuna kolesterool on kõikide steroidhormoonide eellaseks, siis koos rasvumisega suureneb ka vaba östradioli ja testosterooni tase ning lisaks toimub luteiniseeriva hormooni (LH) hüpersekretsioon. Endokriinse keskkonna muutus mõjutab omakorda negatiivselt follikulogeneesi. (Talmor ja Dunphy, 2015)

Rasvumus on seotud insuliini resistentsusega, kõrgvererõhutõvega, düslipideemiaga ja mitmete metaboolsete sündroomidega. Nende mõju follikulogeneesile ja endomeetriumi retseptiivsusele

on lõpuni välja selgitamata, kuid teatav mõju viljatusele on olemas. (Talmor ja Dunphy, 2015). PCOS patsientidel on täheldatud insuliini resistentsust – seisund, kui rakud ei tunne ära insuliini. Rakud ei reageeri insuliinile ning glükoosi kontsentratsioon veres tõuseb, mille tõttu toodetakse veel rohkem insuliini. Tulemuseks on hüperinsulineemia, mis stimuleerib liigset androgeeni produktsiooni munasarjas. (Diamanti-Kandarakis ja Dunaif, 2012)

Polütsüstilise munasarja sündroomiga naistel on kõrgem risk raseduse komplikatsioonideks kui tervetel naistel. Kuni 50% rasedustest katkeb (Chakraborty et al., 2013) ja paljud sünnitavad ennetähtaegselt. Ohuks on neil suurenenud vererõhk, preeklampsia (rasedusmürgitus) ja gestatsioonidiabeet (rasedusaegne diabeet). (Palomba et al., 2015)

1.3.3 Polütsüstilise munasarja sündroomi ravi

Kuna PCOS on väga heterogeenne, ei ole sellele ühtset ravi, mistõttu tegeletakse peamiselt sümptomite leevendamisega. Hirsutism ja akne tulenevad kõrgest androgeeni tasemest, mida vähendatakse valkudega, mis seovad androgeeni, blokeerides selle toimet sihtkoos. Kasutatavateks ravimiteks on suukaudsed rasestumisvastased vahendid, antiandrogeenid, glükokortikoidid. (Ehrmann, 2005)

Androgeeni taset vähendatakse ka laparoskoopiaga, mille käigus eemaldatakse tsüstid munasarjast. Munasarjas tsüstide ja strooma hävitamisega kaasneb androgeeni taseme langus ja suureneb FSH tase (taastatakse HPO telg). (Mitra et al., 2015)

Krooniline anovulatsioon on seotud suurenenud riskiga endomeetriumi hüperplaasia ja kartsinoomi tekkeks (Park et al., 2011). Seetõttu neil, kellel pole olnud terve aasta jooksul menstruatsiooni, soovitatakse esmalt vaadelda ultrasonograafiaga endomeetriumi paksust ja kahtluse korral teha biopsia analüüs. Endomeetriumi rakkude kasvu on võimalik inhibeerida progesterooniga või suukaudsete rasestumisvastaste vahenditega, mis sisaldavad endas nii östrogeeni kui ka progesterooni. (Ehrmann, 2005)

Ülekaaluliste naiste puhul on abiks kehakaalu langetamine. See vähendab nii androgeeni kui ka insuliini taset ja parandab munasarja funktsioone. Varasem uuring näitas, et 11 naisest 9 rasestus või taastus normaalne menstruaaltsükkel pärast 5% kaalukaotust (Kiddy et al., 1992). Kaalukaotus aitab ka insuliini resistentsuse ja glükoositalumatuse puhul. (Ehrmann, 2005; dos Santos et al., 2017)

1.3.4 Polütsüstilise munasarja sündroomi geneetilised uuringud

Polütsüstilise munasarja sündroom on heterogeenne haigus ja seda põhjustavad nii geneetilised kui ka keskkonnast tulenevad tegurid. Selle hüpoteesi kinnituseks on läbi viidud palju

uuringuid, leitud ka mitmeid kandidaatgeene, kuid täielikku põhjust siiski ei teata. (Azziz, 2017; Day et al., 2015; Legro et al., 1998)

Palju on uuritud PCOS-i puhul hormoonide taset ja ovulatsioonihäireid. Näiteks on vaadeldud hüperandrogenismi pärilikkust PCOS-i patsientide seas ning tulemuseks saadi, et hüperandrogenism esines 46% õdedel (Legro et al., 1998). Varem on kirjeldatud, et androgeeni poolt reguleeritud geenide ekspressioon on võtmetegur PCOS-i patogeneesi tekkel (Jansen et al., 2004).

Oluline on ka uurida PCOS patsientidel endomeetriumi. Raseduse komplikatsioonid võivad tuleneda muutunud detsidualisatsioonist. Pikas perspektiivis on PCOS-i seostatud ka endomeetriumi kasvajaga. PCOS patsientidel on mitmeid kõrvalekaldeid endomeetriumi funktsioonides ning on oluline uurida, millest see tingitud on. (Piltonen, 2016)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli kirjeldada steroidhormoonide mõju tervete ja PCOS-iga patsientide endomeetriumi strooma rakkudele. Konkreetselt püstitati järgmised ülesanded:

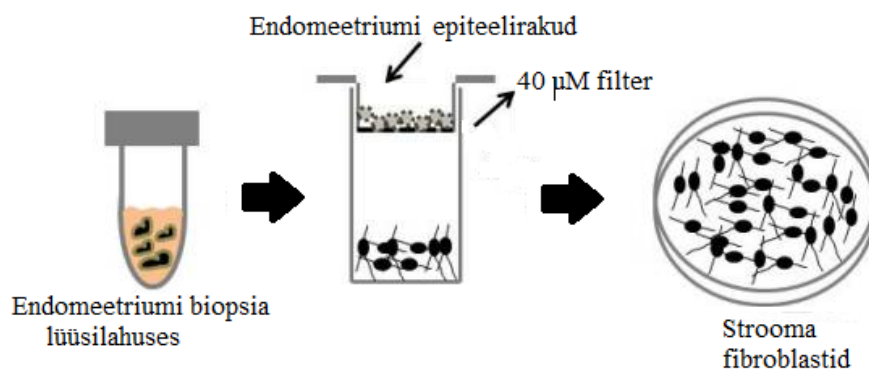
- 1) kuidas steroidhormoonid (östrogeen, progesteron, testosteroon) reguleerivad geeniekspressiooni endomeetriumi strooma rakkudes RT-qPCR abil;
- 2) võrrelda geeniekspressiooni tervetel ja PCOS-iga patsientidel;
- 3) võrrelda rakukultuuris kasvatatud ja indutseeritud MS faasi geeniekspressiooni stroomast eraldatud rakkude geeniekspressiooniga

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Rakkude kogumine ja kasvatamine

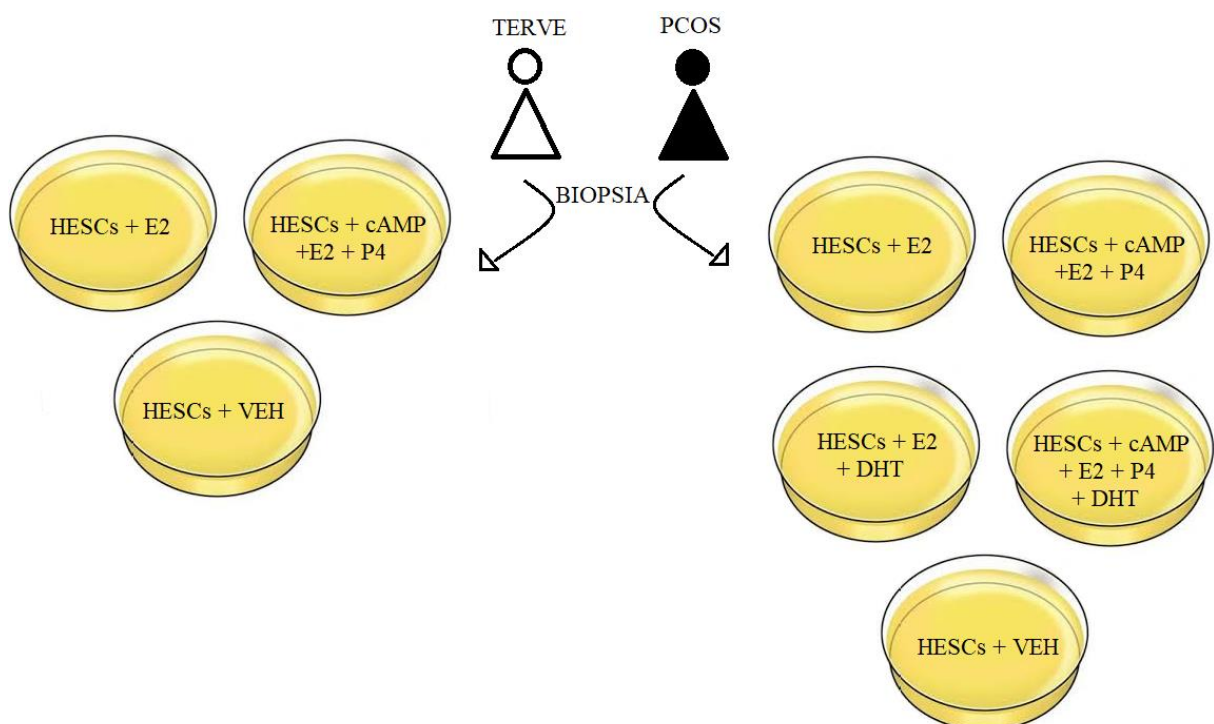
Eksperimentide läbiviimiseks kasutati endomeetriumi strooma fibroblasti rakke (saadud Prof. Terhi Piltonen'ilt ja Masuma Khatun'ilt, Oulu Ülikool, Soome), mis eraldati heterogeensest koest, vastavalt varasemalt kirjeldatud meetodile (Chen ja Roan, 2015). Koguti kahe terve ja kahe PCOS diagnoosiga naise endomeetriumi strooma rakkude (HESCs) biopsiad. Koeproovid olid pärit naistelt, kes olid vanuses 24-41 aastat. Tervete patsientide kehamassiindeksid (KMI) jäid „normaalkaalu“ ning haigete KMI-d „rasvunud“ kategooriasse. PCOS patsientidel esines munasarjade polütsüstilisus ja hirsutism.

Kogutud rakud jaotati kaheks (endomeetriumi epiteelirakud ja strooma fibroblastid) kasutades 0,1% kollageenaasi ja 0,02% deoksünukleaasi lahust, mis on kaltsiumi ja magneesiumi vaba, tasakaalustatud Hanksi soolalahus (Joonis 6). Strooma rakke kasvatati 2% SCM (*Stromal cell medium*) söötmes. Kõikidele söötmetele oli lisatud fenoolpunasevaba RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) lahust koos 0,1mM naatriumpüruvaadiga, 100 U/ml penitsilliini, 100 lg/ml streptomütsiini ja 10% dekstraaniga töödeldud veise loote seerumit (S-FBS).



Joonis 6. Strooma fibroblastide eraldamine (kohandatud Chen ja Roan, 2015).

Rakke kasvatati 100mm läbimõõduga koekultuuri tassidel kuni kahe passaažini 37°C juures 5%-lisel CO₂ kontsentratsioonil. Kui rakud saavutasid 90% konfluentsuse, töödeldi neid steroidhormoonidega. Steroidhormoonide kontsentratsioonid on järgmised: E2 – 10 nM, P4 – 1 µM, DHT – 100nM. Lisaks kasutati virgatsainet Br-cAMP (edasipidi cAMP) 0,5mM, rakkude töötlustel on esitatud joonisel 7.



Joonis 7: Rakkude töötlemine. Terve naise rakke töödeldi 3h östrogeeniga, 4 päeva cAMP ja 3h progesterooniga, 3h etanooliga (VEH – vehicle). PCOS diagnoosiga naise rakke töödeldi järgmiselt: 3h östrogeeniga (E2), 3h östrogeeni ja dihidrotestosterooniga (E2+DHT), 4 päeva cAMP ja 3h östrogeeni ja progesterooniga (E2+P4), 4 päeva cAMP ja 3h östrogeeni, progesterooni ja dihidrotestosterooniga (E2+P4+DHT), 3h etanooliga (VEH).

Hormoonide töötluks valiti 3 tundi, et vaadelda esmast vastust hormoontöötluksle. Tsükliilise AMP-ga inkubeeriti aga 4 päeva, et indutseerida detsidualisatsiooni, mis võimaldab eelsekretoorses (ES) faasis rakkudel üle minna kesksekretoorsesse faasi (MS).

Rakkude kogumine ja rakukultuuri katsed toimusid Oulu Ülikoolis ning RNA eraldamised ja geeniekspressiooni katsed Tervisetehnoloogiate Arenduskeskuses.

2.2.2 RNA eraldamine

Töödeldud rakkudest eraldati totaalne RNA RNeasy Mini Kitiga (Qiagen, Hilden, Saksamaa), kasutades tootja originaalprotokolli.

Antud töös kasutati 10 cm läbimõõduga koekultuuri tasse. Tassi suurusest ja rakkude kogusest tulenevalt (5-10 M rakku) lisati tassile 600 µl raku lüüsipuhvrit RLT (Qiagen). Rakulüsaati homogeniseeriti läbi süstlanõela 10 korda. Lisati 600 µl 70% etanooli, pipeteeriti RNeasy Spin tuubi (Qiagen), tsentrifuugiti 15 sekundit 8000 x g juures, mis sidus RNA kolonni membraanile. Membraan pesti 350 µl puhvri RW1-ga (Qiagen), tsentrifuugiti 15 sekundit 8000 x g juures. Edaspidi töödeldi RNA-d DNaaiga: valmistati lahus, kuhu lisati iga proovi kohta 10 µl DNaa si ja 70 µl puhvrit RDD (Qiagen). Järgnevalt lisati eelnevalt valmistatud DNaa si-puhvri segu (80 µl) otse kolonni membraanile ja inkubeeriti 30°C juures 15 minutit. Järgmiseks lisati 350 µl pesupuhvrit RW1 (Qiagen) kolonni ja tsentrifuugiti 15 sekundit 8000 x g juures. Pesu jätkati puhviga RPE (Qiagen): kolonni lisati 500 µl puhvrit ning tsentrifuugiti 15 sek 8000 x g, mida korrati kaks korda. Et kuivatada RNA-d etanooli jääkidest, tsentrifuugiti kolonnid 10000 x g juures 1 min. Järgmiseks toimus RNA elueerimine. Lisati 30 µl RNAa si-vaba vett otse kolonnis olevale membraanile ja tsentrifuugiti 1 minut 8000 x g juures. Viimast sammu korrati veel üks kord, et suurendada eraldatud RNA kogust. Katse tulemusena saadi rakkudest eraldatud RNA-d 60 µl, mille kontsentratsioon jäi vahemikku 135...450 ng/µl.

Eraldatud RNA puhtust ja kontsentratsiooni mää rati NanoDrop™ 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

2.2.3 Komplementaarse DNA sünteesimine

Saadud RNA-st sünteesiti cDNA *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*-iga (Thermo Scientific, Wilmington, USA), kasutades tootja originaalprotokolli.

Reaktsiooni ettevalmistus toimus jääl. Tuubi lisati 0,9 µg totaalset RNAd, 1 µl Random Hexamer praimerit (100 µM) ja milli-Q vett mahuni 12 µl. Seejärel 4 µl 5x reaktsioonipuhvrit, 2 µl 10 mM dNTP segu ning viimasena RiboLock RNAa si inhibiitorit (20 U/µl) ja RevertAid M-MuLV RT-d (200 U/µl), kumbagi 1 µl. Komponendid tuubis segati ja tsentrifuugiti. Saadud

20 µl reaktsioonisegu inkubeeriti 5 minutit 25°C juures, millele järgnes 60 minutit 42°C juures. Reaktsiooni lõpetamiseks kuumutati 70°C juures 5 minutit.

Saadud cDNA puhtust ja kontsentratsiooni määrati NanoDrop™ 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

2.2.4 Geenide ja nende praimerite valik

Geenid ekspressiooni analüüsiks valiti PubMed-is (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) olevate artiklite põhjal. Väljavalitud geenide nimekiri sisaldas tuntud detsidualisatsiooni ja PCOS markereid, retseptiivsuse ja metabolismiga seotud geene. Praimerid uuritavate geenide analüüsimiseks võeti PrimerBank andmebaasist (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) ja nende sobilikkust analüüsiti GenomeTester 1.3 programmis (<http://bioinfo.ut.ee/genometester/>), jälgides seondumissaitide ja produktide arvu.

Töö käigus valiti välja 19 geeni (Tabel 1), nende praimerite järjestus on esitatud lisas 1. Koduhoidja geeniks valiti TBP (Vandesompele et al., 2002).

Tabel 1. Uuringus kasutatud geenid

	Geeni lühend	Geeni nimi	Ülesanne
1	<i>AR</i>	Androgen receptor	Geeni produktiks on androgeeni siduv valk. Selle ekspressioon on PCOS patsientidel erinev tervetest. (Urbanek et al., 1999; Piltonen, 2016)
2	<i>CCL2</i>	C-C motif chemokine ligand 2	Immunoregulaator, mis osaleb põletikulistes protsessides. PCOS munasarjades on antud geen alla reguleeritud. (Schmidt et al., 2014; Piltonen, 2016)
3	<i>CCND1</i>	Cyclin D1	Östradiool ja testosteroon mõjutavad raku proliferatsiooni. Geeni ekspresseeritakse terves ja PCOS patsiendis erinevalt. (Plaza-Parrochia et al., 2014)
4	<i>CTSB</i>	Cathepsin B	Transpordib gaase ja nii mikro- kui makroelemente, mis on olulised endomeetriumi kasvuks, et embrüo saaks kinnituda. Strooma spetsiifiline marker. Üles reguleeritud, kui detsidualisatsioon on toimunud. (Song et al., 2010)
5	<i>DKK1</i>	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	Strooma spetsiifiline marker ja retseptiivsuse marker. Geen on reguleeritud östrogeeni ja progesterooniga. (Wang et al., 2009)
6	<i>DUSP1</i>	Dual specificity phosphatase 1	Fosfataasi kodeeriv geen. Osaleb mitmes rakulises protsessis. On täheldatud ekspressiooni alla reguleerimist PCOS patsientidel. Mõjutab ovulatsiooni. (Jansen et al., 2004)

7	<i>FOXO1</i>	Forkhead box O1	On täheldatud tema ekspressiooni muutust munasarjas ja endomeetriumis, mis on reguleeritud östrogeeni ja progesterooniga (Wang et al., 2009).
8	<i>GLUT4</i>	Endometrial glucose transporter 4	Endomeetriumis <i>GLUT4</i> ekspressiooni muutused PCOS patsiendil on seotud androgeeni retseptori geeni pärssimisega. Samuti mõjutab insuliini retseptorit. Antud geen on PCOS-i ja detsidualisatsiooni marker ning peaks olema alla reguleeritud proliferatsiooni faasis. (Piltonen, 2016; Li et al., 2015)
9	<i>GPX3</i>	Glutathione peroxidase 3	Geeni ekspressioon tõuseb implantatsiooniaknas (Farimani Sanoee et al., 2014).
10	<i>IGF2</i>	Insulin like growth factor 2	Antud geen kodeerib insuliinisarnast kasvufaktorit 2, mis stimuleerib insuliini toimet nagu näiteks munasarjades androgeeni sekretsiooni. PCOS patsientidel on antud geen üles ekspresseeritud. (Geršak ja Ferk, 2007)
11	<i>IGFBP1</i>	Insulin like growth factor binding protein 1	Endomeetriumi retseptiivsuse ja detsidualisatsiooni marker. (Piltonen, 2016)
12	<i>INSR</i>	Insulin receptor	Aktiveeritud <i>INSR</i> algatab molekulide kaskaadi, sealhulgas insuliini retseptorite substraatite teket. Mängib rolli ka <i>GLUT4</i> translokatsioonil. On PCOS ja detsidualisatsiooni marker. (Shaikh et al., 2014)
13	<i>IRS1</i>	Insulin receptor substrate 1	On vahendaja insuliini ja tema retseptori vahel. On kirjeldatud ekspressiooni muutust PCOS patsientidel. (Urbanek et al., 1999; Kosova ja Urbanek, 2013)
14	<i>MAP3K4</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	On seotud androgeeni ja östrogeeni metabolismiga. PCOS patsientidel hüpoteesi kohaselt on geeniekspressioon alla reguleeritud. (Lan et al., 2015)
15	<i>MMP2</i>	Matrix metalloproteinase 2	Osaleb molekulide signaaliülekanDES. Sellelt geenilt kodeeriv valk on seotud endomeetriumi menstruatsiooni häiretega. Testosterooni mõjul on negatiivne efekt rakkude jagunemisel ja detsidualisatsioonil endomeetriumi stooma rakkudes. (Freis et al., 2017)
16	<i>PLAT</i>	Plasminogen activator	On seotud ovulatsiooniga. PCOS patsientidel on see geen üles reguleeritud. (Jansen et al., 2004)
17	<i>PRL</i>	Prolactin	On kasvufaktor mitmetes kudedes, ka immuunsüsteemi rakkudes. Detsidualisatsiooni marker, mis on indutseeritud cAMP mõjul. (Gellersen ja Brosens, 2014)
18	<i>STC1</i>	Stanniocalcin 1	Kesksekretoorses faasis on geeniekspressioon normaalolukorras üles reguleeritud. Mõjutab ka proliferatsiooni endomeetriumis. Retseptiivsuse marker endomeetriumis. (Aghajanova et al., 2016)
19	<i>TBP</i>	TATA-box binding protein	Koduhoidja geen (Vandesompele et al., 2002).

20	<i>TIMP1</i>	TIMP metalloprotease inhibitor 1	Inhibeerib raku proliferatsiooni. Selle geeni pealt kodeeritud RNA osaleb mitmete tsütokiinide ja hormoonide vastustes. PCOS patsientidel peaks see geen olema alla reguleeritud. (Schmidt et al., 2014)
----	--------------	----------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.2.5 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ehk qPCR

Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon teostati, et uurida geeniekspressiooni erinevalt mõjutatud endomeetriumi stroomarakkudes. Kasutati 50 ng cDNA-d, 0,5 µl mõlemat praimerit (lõppkontsentratsioon 250 nM) ning 4 µl 5x EvaGreen® DNA polümeraasi valmislahust (Solis BioDyne, Tartu, Eesti). Negatiivse kontrollina kasutati reaktsioone, mis sisaldasid kõiki eelnimetatud koostisosi, välja arvatud cDNA-d. Kõik reaktsioonid viidi läbi kahes korduses.

Reaktsiooni temperatuuriprotokoll oli järgmine:

DNA polümeraasi aktiveerimine 10 min 95°C juures,

millele järgnes 40 tsüklit:

DNA denaturatsioon 15 sekundit 95°C juures

Praimerite seondumine DNA-ga ja DNA süntees 1 min 60°C juures

Samuti teostati DNA sulamiskõverate analüüs, et kontrollida produkti spetsiifilisust. Õigeks loeti oodatud sulamistemperatuuril ainult ühte produkti sisaldavad reaktsioonid.

2.2.6 Andmete statistiline analüüs

Saadud tulemusi analüüsiti $\Delta\Delta C_t$ meetodiga (Livak ja Schmittgen, 2001). C_t on läviväärtus RT-qPCR tsüklis, andmete analüüsil kasutati duplikaatide aritmeetilist keskmist. ΔC_t on ekspressioonitaseme erinevus võrreldes HK geeniga ning $\Delta\Delta C_t$ on tervete ja PCOS patsientide vaheline ekspressiooni muutus. Analüüs teostati Microsoft Exceli programmis valemiga $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{uuritav geen}) - \Delta C_t(\text{kontroll})$. Ekspressioonimuutuse kordaja näitab mitu korda ekspressioon muutub. Kui ekspressiooni kordaja on alla 1, siis tegemist on geeni alla-regulatsiooniga. Sellisel juhul ekspressiooni muutuse kordarvu (ingl.k. *fold change*) saamiseks arvutati ekspressioonikordaja pöördväärtus. Miinusmärk pandi ekspressiooni muutuse kordarvu ette märgistamiseks, et tegemist on alla-regulatsiooniga.

2.2.7 Ühe rakurakupopulisatsiooni spetsiifiline RNA sekveneerimise meetod

STRT (*single-cell tagged reverse transcription*) RNA sekveneerimise (RNA-seq) andmeid kasutati töös välja valitud geenide ekspressiooni muutuste võrdluseks. Võrreldi tervete, viljakate naiste endomeetriumi stroomarakkude geeniekspressiooni hormoon-töödeldud rakkude geeniekspressiooniga. RNA-seq andmebaas koosnes 19-st proovist eelsekretoorsest ja

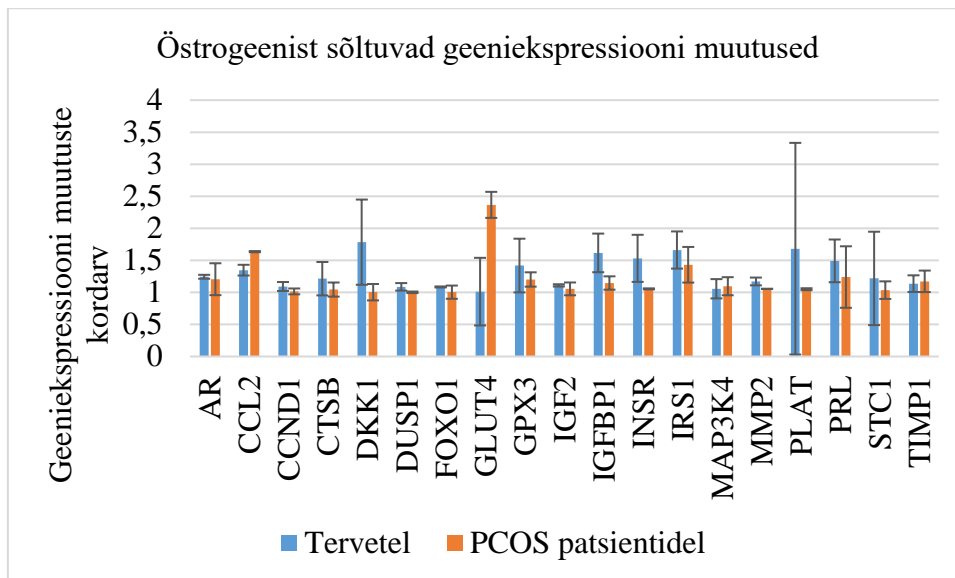
24-st proovist kesksekretoorsest endomeetriumi, mille teostas Mariann Koel (TÜMRI). Endomeetriumi faasi hinnati LH taseme järgi uriiniproovist. Eelsekretoorse faasi proovid võeti kaks päeva pärast LH piiki (LH2) ja kesksekretoorse faasi proovid kaheksa päeva pärast LH piiki (LH8). Tervete naiste biopsiatest eraldati strooma rakupopulatsioon läbivoolutsütomeetriaga, kasutades CD13 stroomarakkude pinnamarkereid. Totaalne RNA eraldati sorteeritud rakkudest, kasutades *RNeasy Micro kit*'i (Qiagen Hilden, Saksamaa), järgides tootja originaalprotokolli. Komplementaarne DNA sünteesiti ja analüüsiti varasemalt kirjeldatud meetodi järgi (Krjutškov et al., 2016). STRT andmed pärinevad Krjutškovi uurimisrühma projektist ja põhjalik informatsioon osalejatest ja proovidest on esitatud varasemas töös (Altmäe et al., 2017).

Varem analüüsitud diferentsiaalsed ekspressiooni väärtused (*differential expression values*) geenides *CCL2*, *CTSB*, *DKK1*, *DUSP1*, *FOXO1*, *GPX3*, *IGF2*, *PRL*, *STC1* ja *TIMP1* olid välja valitud, et võrrelda nendega käesolevas töös saadud geeniekspressioone. Antud geenide ekspressiooni muutused omasid statistilist olulisust STRT analüüsil. Diferentsiaalsed ekspressiooni väärtuseid, mis olid ajapunktis LH8, võrreldi käesoleva uurimustöö tervete naiste progesterooni töötlusega, mis imiteerib kesksekretoorset faasi. Kahe ekspressiooni väärtuste vahel leiti omavaheline seos ehk korrelatsioon. Korrelatsioon teostati Microsoft Exceli programmis, valemiga „*correl*“.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Töötlus östrogeeniga

Esmalt vaatlesime, kuidas hormoonid mõjutasid terve patsiendi geene. Östrogeeniga töötlusel jäid geeniekspressiooni muutused vahemikku 1,012...1,784. Kõik tulemused on esitatud lisas 2. Võrdluseks vaatlesime samasugust töötlust PCOS patsiendi puhul, kus geeniekspressioon jäi vahemikku 1,002 ... 2,4, kus kõige suurem muutus toimus geen *GLUT4* (Joonis 8). Varasemates töödes pole östrogeeniga töödeldud endomeetriumi koes *GLUT4* geeniekspressiooni muutust statistiliselt oluliseks peetud (Cui et al., 2015). Seega on plaanis teostada korduskatsed, selgitamaks, kas muutus on statistiliselt oluline, kuna väheste proovide tõttu ei olnud võimalik määrata selles töös statistilist olulisust.



Joonis 8. Östrogeenist sõltuvad suhtelised ekspressiooni muutused. Andmed on esitatud aritmeetilise keskmise kordavuna, võrrelduna kontrolltöötlusega. Veapiirideks on standardhälve.

Östrogeeni töötlustest peaksid olema mõjutatud järgmised rakkude jagunemise eest vastutavad geenid: *CCND1*, *DKK1* ja *FOXO1*. Katsetes leidsime, et antud geenide ekspressiooni muutus vähe, mis võis olla tingitud lühikesest hormoontöötlustest. Teistes töödes on nähtud östrogeeni mõju alles 12 tunni möödudes, olgugi et endomeetriumi epiteelrakkudes (Tamm et al., 2009). Edasipidi on plaanis teha pikema inkubatsiooniajaga hormoontöötlusted.

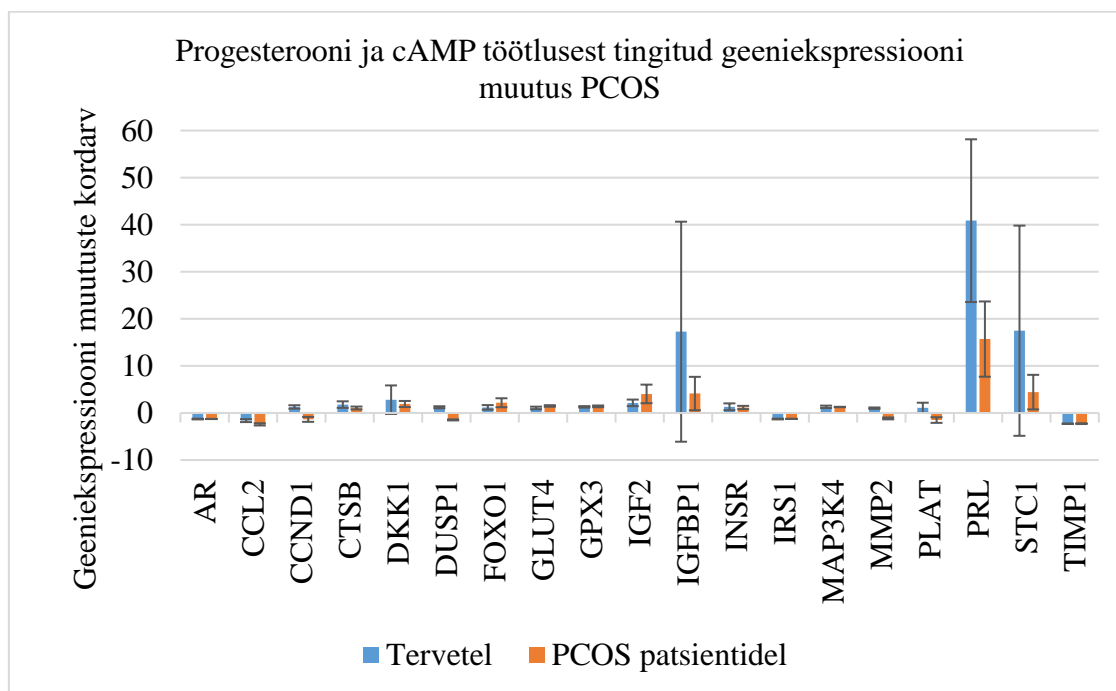
2.3.2 Töötlus progesterooniga

Tervetel patsientidel oli suurim geeniekspressiooni muutus toimunud geenis *PRL*, mis oli üles reguleeritud 40,9 korda. Üles oli reguleeritud ka *IGFBP1*, mille ekspressioon muutus 17,3 korda. PCOS patsientidel oli samuti *PRL* ja *IGFBP1* geeniekspressioon üles reguleeritud, kuid muutus oli märgatavamalt väiksem kui kontrollrühmal (Joonis 9). *PRL* on üles reguleeritud 15,7 korda (38% väiksem ekspressiooni muutus võrreldes kontrolliga) ning *IGFBP1* 4,1 korda (24% väiksem ekspressiooni muutus võrreldes kontrolliga).

Tsüklilise AMP mõjul indutseeritakse kasvatatud rakkudel detsidualisatsiooni ning geenide *PRL* ja *IGFBP1* ekspressiooni tõus oli kinnituseks, et protsess toimus (Gellersen ja Brosens, 2014). Tervetel patsientidel oli ekspressiooni tõus olemas ja detsidualisatsioon ilmselt ka toimunud. PCOS patsientidel oli aga geeniekspressiooni muutus väiksem ning on võimalik, et neil on detsidualisatsioon häiritud ega toimu sama efektiivselt kui tervetel.

Lisaks oli suurem muutus toimunud ka geenis *STC1*. Tervel naisel peaks *STC1* olema kesksekretoorses faasis tugevalt üles reguleeritud võrreldes eelsekretoorse faasiga. Ka meie

tulemuste puhul on see kontrollgrupile iseloomulik: östrogeeniga töötlusel (Joonis 8) sel geenil muutust ei täheldatud ning P4 ja cAMP töötlusel ekspressioon tõusis 17 korda. PCOS patsiendi puhul me nii suurt muutust aga ei näinud. On kirjeldatud, et *STC1* on mõjutatud cAMP poolt ning on seostatud detsidualisatsiooni düsregulatsiooniga. Lisaks on sellist olukorda varem täheldatud ka endometrioosi ja idiopaatilise viljatuse puhul (Aghajanova et al., 2015, 2016).

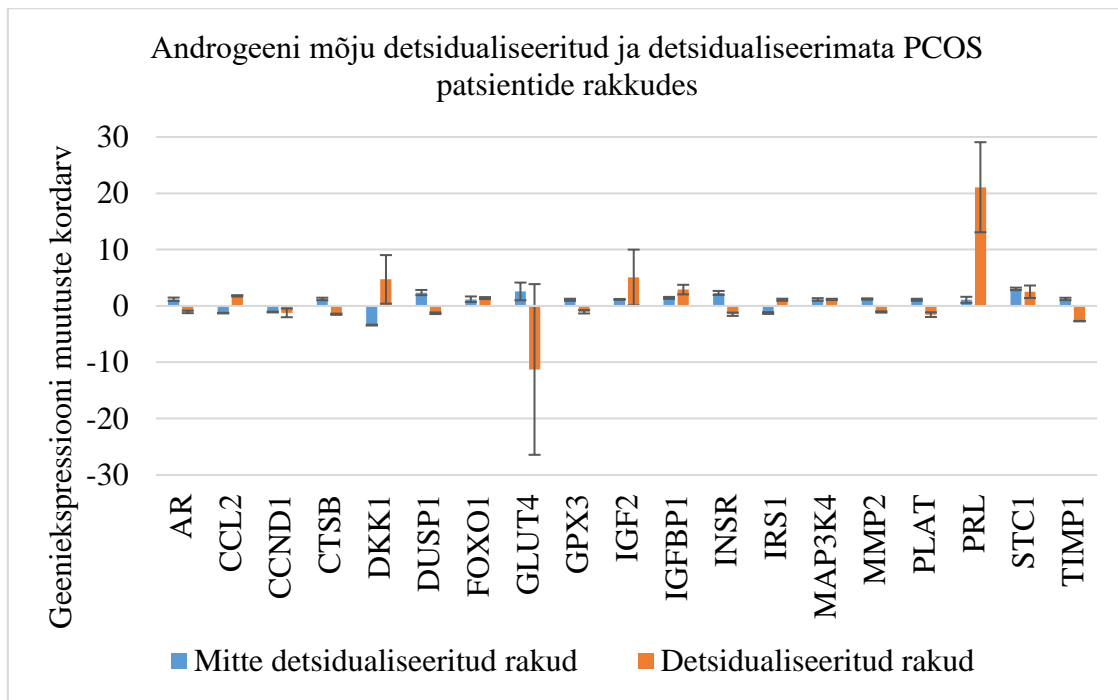


Joonis 9. Progesterooni töötlustest tingitud geeniekspressiooni muutused. Andmed on esitatud aritmeetilise keskmise kordavuna, võrrelduna kontrolltöötlusega. Veapiirideks on standardhälve.

Progesterooni roll oli osaleda rakkude detsidualisatsioonis ja juhtida geeniekspressiooni retseptiivse endomeetriumi fenotüübi suunas. Paraku ilmus siin välja katse üks kitsaskoht – cAMP mõjust tingitud efekt varjutab P4 poolt indutseeritud ekspressiooni muutusi. Tuleks sooritada eraldi P4 ja cAMP töötlus, mille abil saaks analüüsida P4 mõju. Antud töös me ei näinud P4 mõju vaid P4 ja cAMP koosmõju ning võib oletada, et cAMP-l endal oli tugevam mõju kui P4-l. Progesteron kutsub esile rakkude proliferatsiooni enne detsidualisatsiooni (Vallejo et al., 2014).

2.3.3 Töötlus dihidrotestosterooniga

Erinevalt tervetest, töödeldi PCOS patsiendi rakke ka androgeeniga DHT. Võrreldud oli PCOS rakkude töötlust: E2+P4+DHT+cAMP (uuritav) vs E2+P4+cAMP (kontroll) ja E2+DHT (uuritav) vs E2 (kontroll).



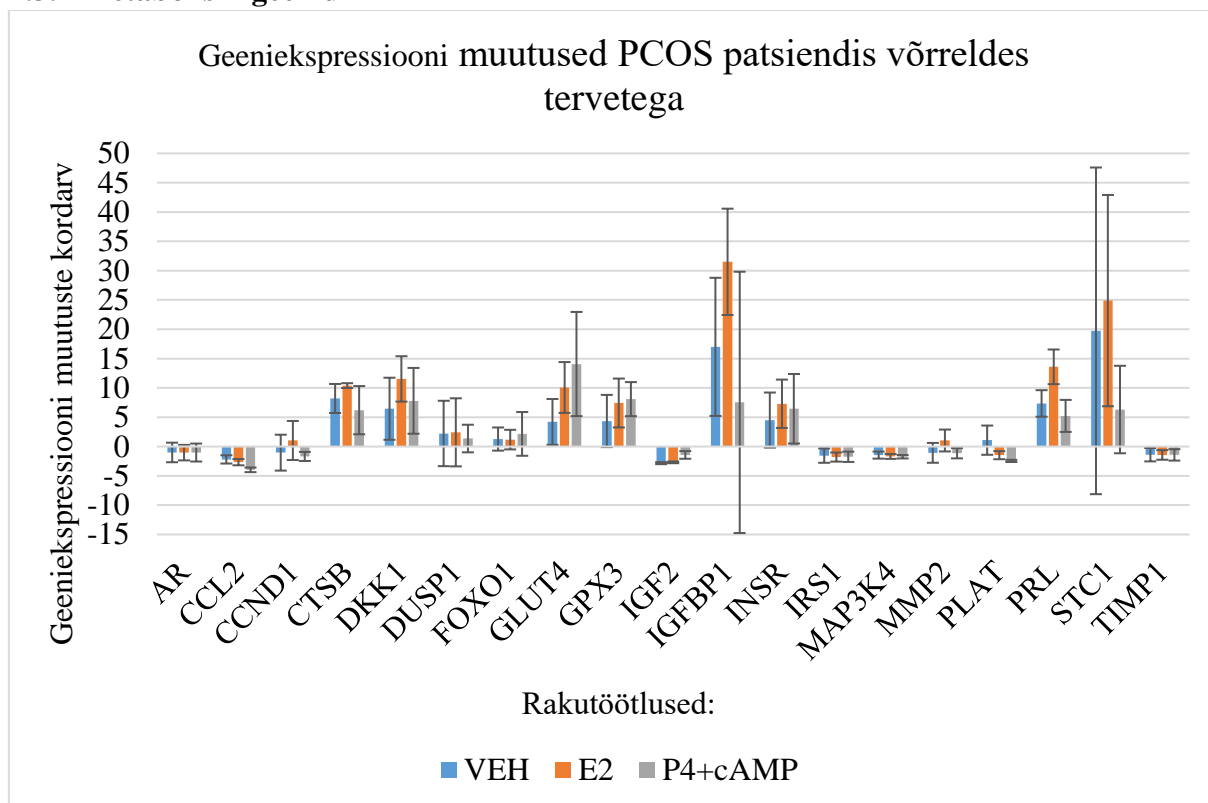
Joonis 10. Geeniekspressiooni muutused, mis on tingitud androgeeni lisamisest PCOS patsientidel detsidualiseeritud ja detsidualiseerimata rakkudes. Andmed on esitatud aritmeetilise keskmise kordavuna, võrrelduna kontrolltöötusega. Veapiirideks on standardhälve.

Detsidualiseeritud rakkudes oli androgeeni mõjul *PRL* üles reguleeritud 21 korda (Joonis 10). Antud tõus on oodatud tulemus detsidualiseeritud rakkude puhul, nagu juba eespool kirjeldatud.

GLUT4 geeniekspressioon oli detsidualiseeritud rakkudes alla reguleeritud 11,3 korda,. Varasemalt on kirjeldatud, et rottidel, kellele on manustatud DHT, on *GLUT4* ekspressioon endomeetriumi strooma rakkudes statistiliselt oluliselt vähenenud (Li et al., 2015). Samuti on leitud *GLUT4* ekspressiooni vähenemist endomeetriumi epiteelrakkudes (Zhang ja Liao, 2010). Nende vaatluste põhjal võib oletada, et hüperandrogeneemia PCOS patsientidel võib otseselt mõjutada *GLUT4* ekspressiooni.

Suuremate muutustena võib veel välja tuua *IGF2* ja *DKK1*. Neid käsitletakse metabolismi alapunktis.

2.3.4 Metabolismigeenid



Joonis 11. PCOS rakkude geeniekspressiooni muutused võrreldes tervetega. Andmed on esitatud aritmeetilise keskmise kordavuna, võrrelduna kontrolltöötlusega. Veapiirideks on standardhälve.

PCOS patsientidel oli tervetega võrreldes üles reguleeritud *DKK1*, mis viitab Wnt signaaliraja häirumisele (Joonis 11). On kirjeldatud, et kui *DKK1* on üles reguleeritud, siis Wnt rajas on häired ning testosterooni sünteesi neerupealiste koos ei pärsita (Wood et al., 2004). See võib olla üheks põhjuseks, miks PCOS patsientidel on kõrgem androgeenide tase veres. Teistes töodes on samuti märgatud Wnt signaaliraja muutust PCOS patsientidel kontrolliga võrreldes (Jansen et al., 2004). Wnt raja kaudu on reguleeritud rakkude kasvamise ja diferentseerumise ning probleemid selles rajas võivad viia retseptiivse fenotüübi häiringule (Wang et al., 2009). Wnt raja häireid seostatakse ka hüperplaasiaga endomeetriumis, mida esineb PCOS-iga patsientide seas 21,4% (Park et al., 2011; Wang et al., 2009).

CCL2 oli 2,5 korda ja *TIMP1* 2,3 korda alla reguleeritud PCOS patsientidel progesterooni töötlusega (Joonis 9). *CCL2* on immunoregulaator ja on püstitatud hüpotees, et PCOS põhjustajaks võivad olla põletikulised protsessid (Schmidt et al., 2014). *TIMP1* inhibeerib raku proliferatsiooni ja see geen on reguleeritud mitmete tsütokiinide ja hormoonide poolt. Varasemalt on kirjeldatud, et PCOS patsientidel on see geen alla reguleeritud nagu ka käesolevas töös. (Schmidt et al., 2014; Piltonen, 2016)

Varasemalt on märgatud *DUSP1* tugevat alla reguleeritust PCOS patsientide munasarjades (Jansen et al., 2004). *DUSP1* alla reguleeritust selles töös ei täheldatud, küll aga oli *MAP3K4* alla reguleeritud PCOS patsientidel võrreldes tervetega (Joonis 11). *DUSP1* poolt mõjutatud substraadid osalevad mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaaside radadel (nagu p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) rada). Kuna need rajad on *DUSP1* fosfataasi aktiivsuse poolt inaktiveeritud, võib madalam *DUSP1* mRNA tase PCOS munasarjades aktiveerida eelmainitud signaaliradu. Nende aktivatsioon on vajalik põletikuvastaste tsütokiinide (nagu TNF) poolt indutseeritud apoptoosi vahendamiseks. (Jansen et al., 2004) *MAP3K4* on samuti MAPK kaskaadi geen ning selle ekspressiooni langust on varem kirjeldatud munasarjade granuloosarakkudes. On leitud korrelatsioon *MAP3K4* ja reproduktiivsuse vahel, kus järeldati, et MAPK signaalirada mängib olulist rolli PCOS-i patogeneesis. (Lan et al., 2015)

IRS1 oli alla reguleeritud PCOS patsientidel võrreldes kontrolliga (Joonis 11) ja *GLUT4* geeniekspressioon oli alla reguleeritud androgeeni töötlusega (Joonis 10). Insuliini retseptori substraat (IRS) on vahendajaks insuliini ja tema retseptori vahel. Varasemates töödes on välja toodud, et *IRS1* on PCOS patsientidel alla reguleeritud. (Piltonen, 2016). *IRS1* geeni alla regulatsioon seletab osaliselt insuliini resistentust PCOS patsientidel. Samuti on selle metaboolse rajaga seotud *GLUT4*, mis peaks olema samuti alla reguleeritud. On kirjeldatud, et androgeen võib moduleerida insuliinist sõltuva glükoositransporteri (*GLUT4*) lokalisatsiooni plasmamembraanis. Veel on kirjeldatud, et endomeetriumi epiteelirakukultuuris väheneb *IRS1* ja *GLUT4* ekspressioon testosterooni mõjul. Nende tõendite põhjal järeldati, et kõrge androgeeni tase PCOS patsientidel võib häirida insuliini signaalirada. (Fornes et al., 2010; Zhang ja Liao, 2010).

IGF2 ekspressioon oli androgeeniga töödeldud PCOS rakkudes 5 korda üles reguleeritud (Joonis 10). Eelnevalt on kirjeldatud, et PCOS patsientidel on geen *IGF2* ühenukleotiidne polümorfism, mille tagajärjel on geen üles reguleeritud kontrollrühmaga võrreldes. *IGF2* kodeerib insuliinisarnast kasvufaktorit 2 (*IGF2*), mis jälgendab insuliini toimeid. (Geršak ja Ferk, 2007) Nii *IGF2* kui ka insuliin seonduvad *IGF1* retseptorile. Düsuregulatsioon *IGF1*/insuliin või *IGF2*/*IGF1R* süsteemis võib viia polütsüstilise munasarja sündroomini. *IGF1R* võib stimuleerida androgeeni tootmist munasarja rakkudes. (Correia et al., 2017; Shaikh et al., 2014)

2.3.5 Polütsüstilise munasarja sündroomi markergeenid

Varasemates artiklites on kirjeldatud *GLUT4* ja *INSR* ekspressiooni alla reguleeritust PCOS patsientide endomeetriumis võrreldes tervetega (Cui et al., 2015; Jones et al., 2015; Li et al., 2015). Antud töös nähti, et *GLUT4* oli tugevamini ekspresseerunud PCOS patsientides

võrreldes tervetega (Joonis 11). On kirjeldatud, et *GLUT4* ekspressioon ei ole mõjutatud PCOS-ist endast vaid just ülekaalulisuse tõttu, kuna *GLUT4* üles ekspressiooni on varasemates uuringutes täheldatud just rasvunud PCOS patsienditel (Mozzanega et al., 2004). Ka käesoleval uuringul osalenud polütsüstilise munasarja sündroomiga patsiendid olid rasvunud ja kooskõlas kirjandusega võib oletada, et *GLUT4* ekspressioonil ja rasvumusel on omavaheline seos, kuid selle geeni ekspressiooni uurimiseks PCOS patsientidel oleks vajalik suurem ja heterogeensem valim. PCOS patsientidel on insuliini tolerantsus üks paljudest sümptomitest, mille üle diskuteeritakse, kas sellel on otsene seos või mitte. Teisest küljest oli androgeeni töötlusega *GLUT4* alla reguleeritud (Joonis 10), seega antud geen on ka androgeenist sõltuv. Varasemates töödes on kirjeldatud, et hüperandrogeneemia puhul peaks *GLUT4* proliferatsiooni faasis olema alla reguleeritud (Piltonen, 2016; Li et al., 2015).

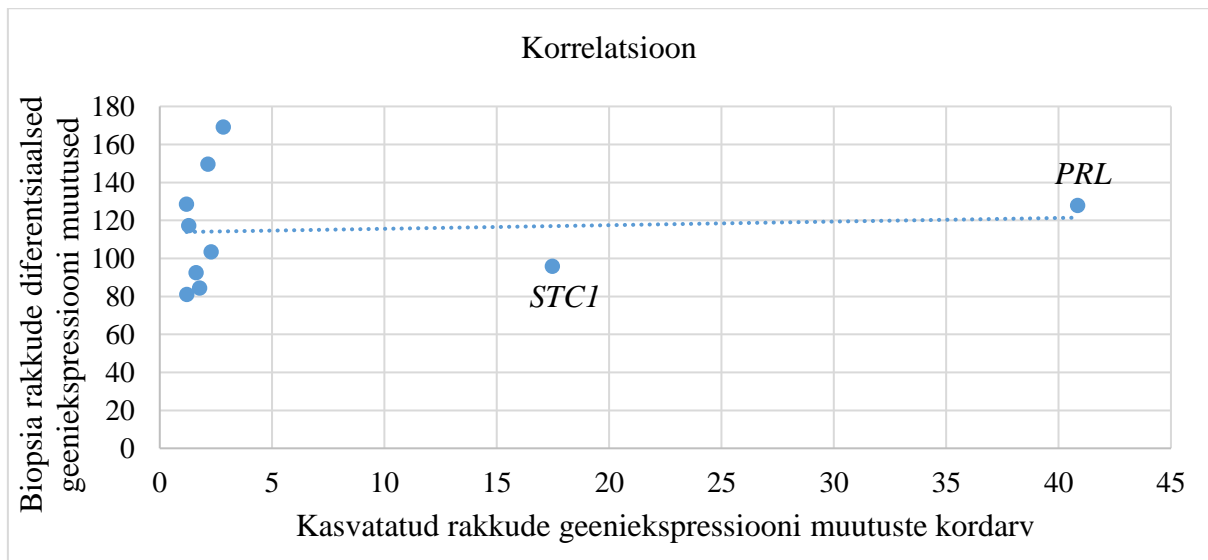
Geen *INSR* oli PCOS patsientidel võrreldes tervetega üles reguleeritud. *INSR* kodeerib alfa ja beeta subühikuid, millest pannakse kokku insuliini retseptor, mis on aluseks insuliini signalisatsioonirajale. PCOS patsientidel on insuliini rada häiritud ning tulemuseks on insuliini resistentsus. (Shaikh et al., 2014)

PCOS patsientidel on ekspressiooni muutus täheldatav ka *IGFBP1*, *STC1*, *CTSB*, *DKK1*, *PRL* puhul (Joonis 11). Erinevus esineb juba ilma hormoonideta töötlusel, mistõttu võib oletada, et PCOS patsientidel on need geenid tavapärasest kõrgemalt ekspresseeritud.

2.3.6 Koekultuuris kasvatatud rakkude võrdlus biopsia rakkudega

Selleks, et selgitada, kas hormoontöeldatud rakkude ekspressioon sarnaneb biopsiarakkude ekspressiooniga, sooritati geeniekspressiooni korrelatsioonianalüüs. Võrreldi endomeetriumi eraldatud MS strooma rakkude ja rakukultuuris kasvatatud ning hormoonidega töödeldud rakkude geeniekspressiooni. Rakkude geeniekspressioonid omavahel ei korreleerunud ehk biopsiast pärinevad rakud ei sarnanenud kasvatatud rakkudega, olgugi et väikest sarnasust oli näha kahes geenis: *STC1* ja *PRL* (Joonis 12). Põhjuseks oli ilmselt liiga väike hormoonidega töötluse aeg, kus näeme varajast ekspressiooni tõusu, mistõttu kõikide geenide ekspressioon pole veel avaldunud nii nagu organismis, eriti metabolismist sõltuvate geenide ekspressioon.

Ekspressiooni muutuste suur erinevus võib tuleneda ka asjaolust, et rakke kasvatatakse eraldatuna erinevates tassides, seega rakkudevahelist suhtlust ei saa toimuda ja geeniekspressioon võib olla sellest mõjutatud. Rakkude parakriinsete interaktsioonide puudumist on varemgi probleemiks peetud (Chen et al., 2013), mis on *in vitro* katsete üheks puuduseks.



Joonis 12. Korrelatsioon kasvatatud ja biopsiast saadud rakkude geeniekspressiooni muutuste vahel. Kasutati *CCL2*, *CTSB*, *DDK1*, *DUSP1*, *FOXO1*, *GPX3*, *IGF2*, *PRL*, *STC1* ja *TIMP1* geenide RT-qPCRi abil leitud ekspressiooni muutuste kordarvu kasvatatud rakkudest ja STRT sekveneerimisel saadud diferentsiaalset ekspressiooni muutust sorteeritud strooma rakkudes.

2.3.7 Töö järeldused, kitsaskohad ja tulevikuplaanid

Kokkuvõtteks võib öelda, et käesoleva bakalaureusetöö tulemused näitavad, et PCOS patsientidel on häiritud mõningad metaboolsed rajad nagu Wnt ja insuliini rada. Nende tulemusena toodetakse liigset androgeeni nii neerupealistes kui ka munasarjades. Lisaks nähti, et geen *GLUT4* on mõjutatud androgeenist ja kui võrrelda tervete ja PCOS patsientide *GLUT4* ekspressiooni muutusi, siis kooskõlas kirjandusega võib oletada, et ilmselt on geeniekspressioon mõjutatud ka häiritud insuliini rajast. PCOS patsientidel on häiritud ka endomeetriumi retseptiivsuse fenotüüp ja detsidualisatsiooni protsess. Veel leiti, et biopsiast pärinevad rakud ei sarnane kasvatatud rakkudega, mis on ilmselt tingitud rakkudevahelise suhtluse puudumisest ja on *in vitro* katsete puuduseks.

Eksperimentides oli hormoonide töötlusajaks kolm tundi, millega püüti iseloomustada varajast geeniekspressiooni muutust. Seetõttu olid suhtelised ekspressiooni muutused pigem väikesed, kuid sellega nähti esmast vastust hormoonile.

Antud töös oli valimiks kaks polütsüstilise munasarja sündroomiga patsienti ning kontrolliks kaks tervet inimest – pilootuuringuks on valim piisav, kuid nende tulemuste põhjal ei saa määrata statistilist olulisust. Samuti esines antud töös ΔC_t väärtustes suuri varieerumisi, kuigi HK geen oli stabiilne. Seetõttu on ka veapiirid suured, kuid seda on tulevikus plaanis parandada suurema valimiga.

Edaspidi on plaan sooritada suurem katse, kus oleks rohkem bioloogilisi replikaate, mis võimaldab hinnata statistiliselt olulisi muutusi. Ekspressiooniuuringu jaoks on plaanis lisada erineva inkubeerimisajaga hormoontöötlust. Hormoonide mõju hindamiseks on plaanis viia kokku varajase geeniekspressiooni muutuse tulemused hormoonretseptoritega seotud kromatiini immunosadestamisega ning rakendada RNA sekveneerimist, et omandada parem ülevaade hormoonide poolt indutseeritud ekspressiooni muutustest.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse osas on antud põgusalt ülevaade naise reproduktiivsüsteemi toimimisest ja seda mõjutavatest hormoonidest. Peamiselt on keskendunud naiste polütsüstilise munasarja sündroomile – on kirjeldatud selle hormonaalset regulatsiooni, sellega kaasnevaid probleeme nagu viljatus ning ravivõimalusi.

Eksperimentaalse töö eesmärgiks oli uurida östrogeeni, progesterooni ja testosterooni mõju endomeetriumi stroomarakkude geeniekspressioonile ning võrrelda polütsüstilise munasarja sündroomiga patsientide rakkude geeniekspressiooni tervete naiste geeniekspressiooniga. Töös kasutati kolmetunnist steroidhormoonide töötlust, et oleks näha esmast hormoonidepoolset ekspressiooni muutust.

Östrogeeni töötlusega suuri muutusi ei täheldatud. Progesterooni ja cAMP töötlusega kinnitati tervetel patsientidel detsidualisatsiooni toimumine ning PCOS patsientidel oli detsidualisatsiooni markergeenid väiksema ekspressiooniga kui tervetel, mis võib viidata häiritud detsidualisatsioonile PCOS patsientidel. Töötlus dihidrotestosterooniga ja võrdlus terve ja PCOS patsiendi rakkude *GLUT4* geeniekspressioonis kinnitas meile, et *GLUT4* ekspressioon sõltub nii androgeenist kui ka insuliini rajast, kuid vajab edasi uurimist suuremas valimigrupis, kus oleks võimalik hinnata erinevuste statistilist olulisust.

Lisaks täheldati *INSR* ülesregulatsiooni, mis viitab insuliinist sõltuva raja häiringutele. Antud töös nähti ka Wnt raja antagonistide üles ekspressiooni, mis viitab liigse androgeeni produktsioonile. Samuti täheldati ka *MAP3K4* alla reguleeritust, mis viitab tsütokiinide poolt vahendatud apoptoosi regulatsiooni häirumisele. See võib olla üheks PCOS patogeneesi põhjuseks, kuid antud seosed vajavad veel edasist uurimist.

Käesolev bakalaureusetöö viitab, et PCOS patsientidel on häiritud mõningad metaboolsed rajad ja endomeetriumi retseptiivsuse fenotüüp.

Effects of steroid hormones on gene expression in endometrial stromal cells in patients of polycystic ovary syndrome

Merili Peltser

SUMMARY

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common endocrine and metabolic disorder that affects 5-20% of women in reproductive age. PCOS is a heterogeneous condition and the phenotype varies widely. Main symptoms are androgen excess, ovarian dysfunction and polycystic ovary morphology without any other specific diagnoses. Up to 40% of women are infertile and they face a higher risk of complications during pregnancy. The aetiology and pathogenesis of PCOS is still fully unknown.

The current study describes how steroid hormones (estrogen, progesterone and androgen) regulate specific genes in human endometrium stromal cells and describes differences in gene expression in PCOS patients compared to healthy ones. Gene expression of cultured endometrial stromal fibroblast cells from two healthy and two PCOS patients was analysed using reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) method.

The results of the current work show that marker genes for decidualization – *IGFBP1* and *PRL* are down-regulated in PCOS versus healthy women. *STC1* is down-regulated too and may also be involved in pathogenesis of decidualization defects.

GLUT4 is up-regulated in patients with PCOS except for androgen treatment, so *GLUT4* can be directly regulated by testosterone. *IRS1* was down-regulated in PCOS vs healthy and *INSR* is up-regulated. All of them are part of insulin signaling network and this can be a reason for insulin resistance in polycystic ovary syndrome. High level of androgen may alter insulin signaling in PCOS, but further investigation is needed.

FOXO1 and *DKK1* is up-regulated, they are Wnt pathway antagonists and may be a reason for excess androgen production. Also, we noticed mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway member *MAP3K4* down-regulation. MAPK signaling pathway may play an important role in the pathogenesis of PCOS but further studies are required to clarify these findings.

The outcomes of the current bachelor's thesis present that in patients with PCOS Wnt and insulin signaling and also their decidualization and endometrial receptivity is altered.

TÄNUSÕNAD

Kõige suuremad tänud lähevad minu juhendajatele Marina Suhorutsenkole ja Indrek Teinole, kelle abiga käesolev töö valmis. Lisaks soovin tänada prof. Terhi Piltoneni ja Masuma Khatuni, Oulu Ülikoolist strooma rakkude kogumise ja rakukultuurikatsete teostamise eest ning Mariann Koeli TÜMRI-st, kes lahkelt jagas STRT sekveerimisest saadud ekspressiooni andmeid.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abrao, M.S., Muzii, L., and Marana, R. (2013). Anatomical causes of female infertility and their management. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* 123 Suppl 2, S18-24.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., and Chyatte, M.R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 13.
- Aghajanova, L., Altmae, S., Stavreus-Evers, A., and Giudice, L.C. (2015). Stanniocalcin-1 in Human Endometrium. *Fertil. Steril.* 103, e6–e7.
- Aghajanova, L., Altmäe, S., Kasvandik, S., Salumets, A., Stavreus-Evers, A., and Giudice, L.C. (2016). Stanniocalcin-1 expression in normal human endometrium and dysregulation in endometriosis. *Fertil. Steril.* 106, 681–691.e1.
- Altmäe, S., Koel, M., Võsa, U., Adler, P., Suhorutšenko, M., Laisk-Podar, T., Kukushkina, V., Saare, M., Velthut-Meikas, A., Krjutškov, K., et al. (2017). Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Sci. Rep.* 7.
- Azziz, R. (2017). PCOS: Animal models for PCOS — not the real thing. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 382–384.
- Azziz, R., Carmina, E., Chen, Z., Dunaif, A., Laven, J.S.E., Legro, R.S., Lizneva, D., Natterson-Horowitz, B., Teede, H.J., and Yildiz, B.O. (2016). Polycystic ovary syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16057.
- Bremer, A.A. (2010). Polycystic Ovary Syndrome in the Pediatric Population. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 8, 375–394.
- Chakraborty, P., Goswami, S.K., Rajani, S., Sharma, S., Kabir, S.N., Chakravarty, B., and Jana, K. (2013). Recurrent Pregnancy Loss in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Hyperhomocysteinemia and Insulin Resistance. *PLOS ONE* 8, e64446.
- Chen, J.C., and Roan, N.R. (2015). Isolation and Culture of Human Endometrial Epithelial Cells and Stromal Fibroblasts. *Bio-Protoc.* 5.
- Chen, J.C., Erikson, D.W., Piltonen, T.T., Meyer, M.R., Barragan, F., McIntire, R.H., Tamaresis, J.S., Vo, K.C., Giudice, L.C., and Irwin, J.C. (2013). Coculturing human endometrial epithelial cells and stromal fibroblasts alters cell-specific gene expression and cytokine production. *Fertil. Steril.* 100.
- Correia, P., Eduardo, L., Almeida, D., Cristine, B., de Jesus Simões, M., Abi Haidar, M., Berguio Vidotti, D., and Silva, I. (2017). IGF-1R and Leptin Expression Profile and the Effects of Metformin Treatment on Metabolic and Endocrine Parameters in PCOS Mice.
- Cui, P., Li, X., Wang, X., Feng, Y., Lin, J.-F., Billig, H., and Shao, R. (2015). Lack of cyclical fluctuations of endometrial GLUT4 expression in women with polycystic ovary syndrome: Evidence for direct regulation of GLUT4 by steroid hormones. *BBA Clin.* 4, 85–91.
- Cunningham, F., Leveno, K., Bloom, S., Hauth, J., Rouse, D., and Spong, C. (2010). *Williams obstetrics*, 23rd Edition (2010).

- Day, F.R., Hinds, D.A., Tung, J.Y., Stolk, L., Styrkarsdottir, U., Saxena, R., Bjornes, A., Broer, L., Dunger, D.B., Halldorsson, B.V., et al. (2015). Causal mechanisms and balancing selection inferred from genetic associations with polycystic ovary syndrome. *Nat. Commun.* 6, 8464.
- Diamanti-Kandarakis, E., and Dunaif, A. (2012). Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome Revisited: An Update on Mechanisms and Implications. *Endocr. Rev.* 33, 981–1030.
- Ehrmann, D.A. (2005). Polycystic Ovary Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 352, 1223–1236.
- Farimani Sanoee, M., Alizamir, T., Faramarzi, S., Saidijam, M., Yadegarazari, R., Shabab, N., Rastgoo Haghi, A., and Alizadeh, Z. (2014). Effect of myomectomy on endometrial glutathione peroxidase 3 (GPx3) and glycodelin mRNA expression at the time of the implantation window. *Iran. Biomed. J.* 18, 60–66.
- Fornes, R., Ormazabal, P., Rosas, C., Gabler, F., Vantman, D., Romero, C., and Vega, M. (2010). Changes in the Expression of Insulin Signaling Pathway Molecules in Endometria from Polycystic Ovary Syndrome Women with or without Hyperinsulinemia. *Mol. Med.* 16, 129–136.
- Freis, A., Renke, T., Kämmerer, U., Jauckus, J., Strowitzki, T., and Germeyer, A. (2017). Effects of a hyperandrogenaemic state on the proliferation and decidualization potential in human endometrial stromal cells. *Arch. Gynecol. Obstet.* 295, 1005–1013.
- Gellersen, B., and Brosens, J.J. (2014). Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocr. Rev.* 35, 851–905.
- Geršak, K., and Ferk, P. (2007). Genetics of Polycystic Ovary Syndrome. *Gynaecol Perinatol* ;16(2):53–57.
- Haldre, K. (2014). POLÜTSÜSTILISTE MUNASARJADE SÜNDROOM - ON SAABUNUD AEG DIAGNOOSIKRITEERIUMIDE ÜLEVAATAMISEKS, *Eesti Arst* 2014; 93(9):537–539.
- Hopkinson, Z.E.C., Sattar, N., Fleming, R., and Greer, I.A. (1998). Polycystic ovarian syndrome: the metabolic syndrome comes to gynaecology. *BMJ* 317, 329–332.
- Jansen, E., Laven, J.S.E., Dommerholt, H.B.R., Polman, J., van Rijt, C., van den Hurk, C., Westland, J., Mosselman, S., and Fauser, B.C.J.M. (2004). Abnormal Gene Expression Profiles in Human Ovaries from Polycystic Ovary Syndrome Patients. *Mol. Endocrinol.* 18, 3050–3063.
- Jones, M.R., Brower, M.A., Xu, N., Cui, J., Mengesha, E., Chen, Y.-D.I., Taylor, K.D., Azziz, R., and Goodarzi, M.O. (2015). Systems Genetics Reveals the Functional Context of PCOS Loci and Identifies Genetic and Molecular Mechanisms of Disease Heterogeneity. *PLOS Genet.* 11, e1005455.
- Kelly, C.J., Stenton, S.R., and Lashen, H. (2011). Insulin-like growth factor binding protein-1 in PCOS: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 17, 4–16.
- Kiddy, D.S., Hamilton-Fairley, D., Bush, A., Short, F., Anyaoku, V., Reed, M.J., and Franks, S. (1992). Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 36, 105–111.

- Knochenhauer, E.S., Key, T.J., Kahsar-Miller, M., Waggoner, W., Boots, L.R., and Azziz, R. (1998). Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 3078–3082.
- Kokosar, M., Benrick, A., Perfilyev, A., Fornes, R., Nilsson, E., Maliqueo, M., Behre, C.J., Sazonova, A., Ohlsson, C., Ling, C., et al. (2016). Epigenetic and Transcriptional Alterations in Human Adipose Tissue of Polycystic Ovary Syndrome. *Sci. Rep.* *6*.
- KOSOVA, G., and URBANEK, M. (2013). GENETICS OF THE POLYCYSTIC OVARY SYNDROME. *Mol. Cell. Endocrinol.* *373*, 29–38.
- Krjutškov, K., Katayama, S., Saare, M., Vera-Rodriguez, M., Lubenets, D., Samuel, K., Laisk-Podar, T., Teder, H., Einarsdottir, E., Salumets, A., et al. (2016). Single-cell transcriptome analysis of endometrial tissue. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *31*, 844–853.
- Lan, C.-W., Chen, M.-J., Tai, K.-Y., Yu, D.C., Yang, Y.-C., Jan, P.-S., Yang, Y.-S., Chen, H.-F., and Ho, H.-N. (2015). Functional microarray analysis of differentially expressed genes in granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome related to MAPK/ERK signaling. *Sci. Rep.* *5*, 14994.
- Lebbe, M., and Woodruff, T.K. (2013). Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Mol. Hum. Reprod.* *19*, 828–837.
- Legro, R.S., Driscoll, D., Strauss, J.F., Fox, J., and Dunaif, A. (1998). Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 14956–14960.
- Lepp, A. (2012). Inimese anatoomia. Õpik kõrgkoolidele (Tartu: Tartu Ülikooli kirjastus).
- Li, X., Feng, Y., Lin, J.-F., Billig, H., and Shao, R. (2014). Endometrial progesterone resistance and PCOS. *J. Biomed. Sci.* *21*, 2.
- Li, X., Cui, P., Jiang, H.-Y., Guo, Y.-R., Pishdari, B., Hu, M., Feng, Y., Billig, H., and Shao, R. (2015). Reversing the reduced level of endometrial GLUT4 expression in polycystic ovary syndrome: a mechanistic study of metformin action. *Am. J. Transl. Res.* *7*, 574–586.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* *25*, 402–408.
- Luciano, A.A., Lanzone, A., and Goverde, A.J. (2013). Management of female infertility from hormonal causes. *Int. J. Gynecol. Obstet.* *123*, S9–S17.
- Mahajan, N. (2015). Endometrial receptivity array: Clinical application. *J. Hum. Reprod. Sci.* *8*, 121–129.
- Männik, P. (2010). Endomeetriumi epiteelrakkude muutused viljatutel patsientidel korduvate ebaõnnestunud IVF protseduuride korral. TÜ, Arstiteaduskond, anatoomia instituut.
- Mehdinejadani, S., Amidi, F., Mehdizadeh, M., Barati, M., Safdarian, L., Aflatoonian, R., Alyasin, A., Aghahosseini, M., Pazhohan, A., Hayat, P., et al. (2018). The effects of letrozole and clomiphene citrate on ligands expression of Wnt3, Wnt7a, and Wnt8b in proliferative endometrium of women with Polycystic ovarian syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* *0*, 1–6.

- de Melo, A.S., dos Reis, R.M., Ferriani, R.A., and Vieira, C.S. (2017). Hormonal contraception in women with polycystic ovary syndrome: choices, challenges, and noncontraceptive benefits. *Open Access J. Contracept.* 8, 13–23.
- Mitra, S., Nayak, P.K., and Agrawal, S. (2015). Laparoscopic ovarian drilling: An alternative but not the ultimate in the management of polycystic ovary syndrome. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 6, 40–48.
- Mozzanega, B., Mioni, R., Granzotto, M., Chiarelli, S., Xamin, N., Zuliani, L., Siculo, N., Marchesoni, D., and Vettor, R. (2004). Obesity reduces the expression of GLUT4 in the endometrium of normoinsulinemic women affected by the polycystic ovary syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1034, 364–374.
- Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A., and Björkqvist, S.-E. (2011). Inimese füsioloogia ja anatoomia, lk 446-447, 453-463, 625. 12. täiendatud trükk WSOY. Medicina, Tallinn (Tallinn).
- Palomba, S., Wilde, D., A, M., Falbo, A., Koster, M.P.H., Sala, L., Battista, G., and Fauser, B.C.J.M. (2015). Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Update* 21, 575–592.
- Park, J.C., Lim, S.Y., Jang, T.K., Bae, J.G., Kim, J.I., and Rhee, J.H. (2011). Endometrial histology and predictable clinical factors for endometrial disease in women with polycystic ovary syndrome. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 38, 42–46.
- Pigny, P., Jonard, S., Robert, Y., and Dewailly, D. (2006). Serum Anti-Müllerian Hormone as a Surrogate for Antral Follicle Count for Definition of the Polycystic Ovary Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 941–945.
- Piltonen, T.T. (2016). Polycystic ovary syndrome: Endometrial markers. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 37, 66–79.
- Plaza-Parrochia, F., Bacallao, K., Poblete, C., Gabler, F., Carvajal, R., Romero, C., Valladares, L., and Vega, M. (2014). The role of androst-5-ene-3 β ,17 β -diol (androstenediol) in cell proliferation in endometrium of women with polycystic ovary syndrome. *Steroids* 89, 11–19.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group (2004). Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 81, 19–25.
- Ruiz-Alonso, M., Blesa, D., and Simón, C. (2012). The genomics of the human endometrium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1822, 1931–1942.
- dos Santos, I.K., de Lima Nunes, R., Soares, G.M., de Oliveira Maranhão, T.M., and Dantas, P.M.S. (2017). Exercise and reproductive function in polycystic ovary syndrome: protocol of a systematic review. *Syst. Rev.* 6.
- Savaris, R.F., Groll, J.M., Young, S.L., DeMayo, F.J., Jeong, J.-W., Hamilton, A.E., Giudice, L.C., and Lessey, B.A. (2011). Progesterone Resistance in PCOS Endometrium: A Microarray Analysis in Clomiphene Citrate-Treated and Artificial Menstrual Cycles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 1737–1746.
- Schmidt, J., Weijdegård, B., Mikkelsen, A.L., Lindenberg, S., Nilsson, L., and Brännström, M. (2014). Differential expression of inflammation-related genes in the ovarian stroma and granulosa cells of PCOS women. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 20, 49–58.

- Shaikh, N., Dadachanji, R., and Mukherjee, S. (2014a). Genetic Markers of Polycystic Ovary Syndrome: Emphasis on Insulin Resistance.
- Shaikh, N., Dadachanji, R., and Mukherjee, S. (2014b). Genetic Markers of Polycystic Ovary Syndrome: Emphasis on Insulin Resistance.
- Sildnik, L. (2017). Viljatuse levimus ja viljatuse ning viljatusravile pöördumisega seotud tegurid aastatel 2004 ja 2014 Eestis.
- Song, G., Bailey, D.W., Dunlap, K.A., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., Bazer, F.W., and Johnson, G.A. (2010). Cathepsin B, cathepsin L, and cystatin C in the porcine uterus and placenta: potential roles in endometrial/placental remodeling and in fluid-phase transport of proteins secreted by uterine epithelia across placental areolae. *Biol. Reprod.* 82, 854–864.
- Stein, I.F., and Leventhal, M.L. (1935). Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 29, 181–191.
- Talmor, A., and Dunphy, B. (2015). Female Obesity and Infertility. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 29, 498–506.
- Tamm, K., Rõõm, M., Salumets, A., and Metsis, M. (2009). Genes targeted by the estrogen and progesterone receptors in the human endometrial cell lines HEC1A and RL95-2. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 7, 150.
- Tamm, K., Suhorutšenko, M., Rõõm, M., Simm, J., and Metsis, M. (2011). The Tissue Specific Role of Estrogen and Progesterone in Human Endometrium and Mammary Gland | IntechOpen.
- Teede, H., Deeks, A., and Moran, L. (2010). Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.* 8, 41.
- Tepekoy, F., Akkoyunlu, G., and Demir, R. (2015). The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 32, 337–346.
- The ESHRE Capri Workshop Group (2002). Physiopathological determinants of human infertility.
- Urbanek, M., Legro, R.S., Driscoll, D.A., Azziz, R., Ehrmann, D.A., Norman, R.J., Strauss, J.F., Spielman, R.S., and Dunaif, A. (1999). Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8573–8578.
- Vallejo, G., La Greca, A.D., Tarifa-Reischle, I.C., Mestre-Citrinovitz, A.C., Ballaré, C., Beato, M., and Saragüeta, P. (2014). CDC2 Mediates Progestin Initiated Endometrial Stromal Cell Proliferation: A PR Signaling to Gene Expression Independently of Its Binding to Chromatin. *PLoS ONE* 9.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.1-research0034.11.

Wang, Y., Hanifi-Moghaddam, P., Hanekamp, E.E., Kloosterboer, H.J., Franken, P., Veldscholte, J., van Doorn, H.C., Ewing, P.C., Kim, J.J., Grootegoed, J.A., et al. (2009). Progesterone inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5784–5793.

Wetendorf, M., and DeMayo, F.J. (2012). The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. *Mol. Cell. Endocrinol.* 357, 108–118.

Wood, J.R., Ho, C.K.M., Nelson-Degrave, V.L., McAllister, J.M., and Strauss, J.F. (2004). The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J. Reprod. Immunol.* 63, 51–60.

Zhang, L., and Liao, Q. (2010). Effects of testosterone and metformin on glucose metabolism in endometrium. *Fertil. Steril.* 93, 2295–2298.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Pildid:

1. Palmer, Emily (2013) http://1.bp.blogspot.com/-l32w7eQlvcE/TjBZekdzHoI/AAAAAAAAACmQ/_Zdek_Ko-zI/s1600/Menstrual.jpg (10.05.2018)
2. Mayo Clinic <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/pcos/symptoms-causes/syc-20353439> (10.05.2018)

PubMed <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (20.05.2018)

Med24 <https://www.med24.ee/andmebaasid/rhk10?kood=E28.2> (25.05.2018)

PrimerBank <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> (01.03.2018)

GenomeTester 1.3 <http://bioinfo.ut.ee/genometester/> (01.04.2018)

NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (09.05.2018)

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud praimerid

Praimer	Järjestus 5' > 3'
AR_F	GACGACCAGATGGCTGTCATT
AR_R	GGGCGAAGTAGAGCATCCT
CCL2_F	CAGCCAGATGCAATCAATGCC
CCL2_R	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
CCND1_F	TGGAGCCCGTGAAAAAGAGC
CCND1_R	TCTCCTTCATCTTAGAGGCCAC
CTSB_F	ACAACGTGGACATGAGCTACT
CTSB_R	TCGGTAAACATAACTCTCTGGGG
DKK1_F	CATCAGACTGTGCCTCAGGA
DKK1_R	CCACAGTAACAACGCTGGAA
DUSP1_F	AGTACCCCACTCTACGATCAGG
DUSP1_R	GAAGCGTGATACGCACTGC
FOXO1_F	TGATAACTGGAGTACATTTTCGCC
FOXO1_R	CGGTCATAATGGGTGAGAGTCT
GLUT4_F	TGCAGTTTGGGTACAACATTGG
GLUT4_R	ATGAGGAAGGAGGAAATCATGC
GPX3_F	AGCCGGGGACAAGAGAAGT
GPX3_R	CCAGAATGACCAGACCGAAT
IGF2_F	GTGGCATCGTTGAGGAGTG
IGF2_R	CACGTCCCTCTCGGACTTG
IGFBP1_F	CTATGATGGCTCGAAGGCTC
IGFBP1_R	TTCTTGTTGCAGTTTGGCAG
INSR_F	AAAACGAGGCCCGAAGATTTC
INSR_R	GAGCCCATAGACCCGGAAG
IRS1_F	ACAAACGCTTCTTCGTACTGC
IRS1_R	AGTCAGCCCGCTTGTTGATG
MAP3K4_F	CAATAAGCCTTACCTCAGCCTTG
MAP3K4_R	GTTAAGCCAGAAACCAGACGTA
MMP2_F	TACAGGATCATTGGCTACACACC
MMP2_R	GGTCACATCGCTCCAGACT
PLAT_F	AGCGAGCCAAGGTGTTTCAA
PLAT_R	CTTCCCAGCAAATCCTTCGGG
PRL_F	CATCAACAGCTGCCACACTT
PRL_R	CGTTTGTTTGCTCCTCAAT
STC1_F	CACGAGCTGACTTCAACAGGA
STC1_R	GGATGTGCGTTTGATGTGGG
TIMP1_F	ACCACCTTATACCAGCGTTATGA
TIMP1_R	GGTGTAGACGAACCGGATGTC

Lisa 2. Geeniekspressiooni muutused

Ekspressioonitaseme erinevus terve ja PCOS patsiendi vahel (VEH vs VEH)			
	ddCT	exp rate change	fold change
CTSB	-3,035	8,196	8,196
GLUT4	-2,073	4,206	4,206
IGFBP1	-4,088	17,000	17,000
DKK1	-2,688	6,442	6,442
PRL	-2,878	7,349	7,349
GPX3	-2,123	4,354	4,354
INSR	-2,175	4,516	4,516
STC1	-4,303	19,732	19,732
CCND1	0,060	0,959	-1,042
FOXO1	-0,353	1,277	1,277
DUSP1	-1,155	2,227	2,227
MMP2	0,105	0,930	-1,075
CCL2	1,135	0,455	-2,196
AR	0,010	0,993	-1,007
TIMP1	0,478	0,718	-1,392
IGF2	1,503	0,353	-2,833
MAP3K4	0,545	0,685	-1,459
PLAT	-0,117	1,085	1,085
IRS1	0,630	0,646	-1,548

Östrogeenist sõltuv ekspressiooni muutus tervetel (VEH vs E2)			
	ddCT	exp rate change	fold change
CTSB	0,280	0,824	-1,214
GLUT4	0,018	0,988	-1,012
IGFBP1	0,692	0,619	-1,616
DKK1	0,835	0,561	-1,784
PRL	0,577	0,670	-1,492
GPX3	0,505	0,705	-1,419
INSR	0,615	0,653	-1,532
STC1	0,285	0,821	-1,218
CCND1	0,127	0,915	-1,092
FOXO1	-0,118	1,085	1,085
DUSP1	0,120	0,920	-1,087
MMP2	0,227	0,854	-1,171
CCL2	0,430	0,742	-1,347
AR	-0,315	1,244	1,244
TIMP1	0,185	0,880	-1,137
IGF2	0,150	0,901	-1,110
MAP3K4	-0,080	1,057	1,057
PLAT	-0,750	1,682	1,682
IRS1	-0,733	1,662	1,662

Progesteroonist sõltuv ekspressiooni muutus tervetel (E2 vs E2+P4+cAMP)			
	ddCT	exp rate change	fold change
CTSB	-0,833	1,781	1,781
GLUT4	-0,090	1,064	1,064
IGFBP1	-4,110	17,268	17,268
DKK1	-1,498	2,824	2,824
PRL	-5,353	40,857	40,857
GPX3	-0,375	1,297	1,297
INSR	-0,393	1,313	1,313
STC1	-4,128	17,478	17,478
CCND1	-0,352	1,277	1,277
FOXO1	-0,253	1,191	1,191
DUSP1	-0,273	1,208	1,208
MMP2	-0,030	1,021	1,021
CCL2	0,698	0,617	-1,622
AR	0,370	0,774	-1,292
TIMP1	1,193	0,438	-2,285
IGF2	-1,105	2,151	2,151
MAP3K4	-0,382	1,304	1,304
PLAT	-0,142	1,104	1,104
IRS1	0,360	0,779	-1,283

Eel-sekretoorse faasi erinevus tervetel ja PCOS patsientidel (E2 vs E2)			
	ddCT	exp rate change	fold change
CTSB	-3,378	10,393	10,393
GLUT4	-3,333	10,074	10,074
IGFBP1	-4,978	31,505	31,505
DKK1	-3,528	11,531	11,531
PRL	-3,765	13,595	13,595
GPX3	-2,893	7,426	7,426
INSR	-2,868	7,298	7,298
STC1	-4,638	24,890	24,890
CCND1	-0,045	1,032	1,032
FOXO1	-0,240	1,181	1,181
DUSP1	-1,278	2,424	2,424
MMP2	-0,045	1,032	1,032
CCL2	1,415	0,375	-2,667
AR	0,055	0,963	-1,039
TIMP1	0,523	0,696	-1,436
IGF2	1,430	0,371	-2,694
MAP3K4	0,758	0,592	-1,691
PLAT	0,563	0,677	-1,477
IRS1	0,845	0,557	-1,796

Östrogeenist sõltuv ekspressiooni muutus PCOS patsientidel (VEH vs E2)			
	ddCT	exp rate change	fold change
CTSB	-0,063	1,044	1,044
GLUT4	-1,243	2,366	2,366
IGFBP1	-0,198	1,147	1,147
DKK1	-0,005	1,003	1,003
PRL	-0,310	1,240	1,240
GPX3	-0,265	1,202	1,202
INSR	-0,078	1,055	1,055
STC1	-0,050	1,035	1,035
CCND1	0,022	0,985	-1,016
FOXO1	-0,005	1,003	1,003
DUSP1	-0,003	1,002	1,002
MMP2	0,077	0,948	-1,055
CCL2	0,710	0,611	-1,636
AR	-0,270	1,206	1,206
TIMP1	0,230	0,853	-1,173
IGF2	0,077	0,948	-1,055
MAP3K4	0,133	0,912	-1,096
PLAT	-0,070	1,050	1,050
IRS1	-0,518	1,431	1,431

Progesteroonist sõltuv ekspressiooni muutus PCOS patsientidel (E2 vs E2+P4+cAMP)			
	ddCT	exp rate change	fold change
CTSB	-0,088	1,063	1,063
GLUT4	-0,573	1,487	1,487
IGFBP1	-2,045	4,127	4,127
DKK1	-0,933	1,909	1,909
PRL	-3,973	15,698	15,698
GPX3	-0,498	1,412	1,412
INSR	-0,213	1,159	1,159
STC1	-2,148	4,431	4,431
CCND1	0,448	0,733	-1,364
FOXO1	-1,120	2,173	2,173
DUSP1	0,555	0,681	-1,469
MMP2	0,205	0,868	-1,153
CCL2	1,273	0,414	-2,416
AR	0,350	0,785	-1,275
TIMP1	1,180	0,441	-2,266
IGF2	-2,018	4,049	4,049
MAP3K4	-0,340	1,266	1,266
PLAT	0,588	0,665	-1,503
IRS1	0,320	0,801	-1,248

Sekretoorse faasi erinevus tervetel ja PCOS patsientidel (E2+P4+cAMP vs E2+P4+cAMP)			
	ddCT	exp rate change	fold change
CTSB	-2,633	6,201	6,201
GLUT4	-3,815	14,074	14,074
IGFBP1	-2,913	7,529	7,529
DKK1	-2,963	7,795	7,795
PRL	-2,385	5,223	5,223
GPX3	-3,015	8,084	8,084
INSR	-2,688	6,442	6,442
STC1	-2,658	6,309	6,309
CCND1	0,755	0,593	-1,688
FOXO1	-1,108	2,155	2,155
DUSP1	-0,450	1,366	1,366
MMP2	0,190	0,877	-1,141
CCL2	1,990	0,252	-3,972
AR	0,035	0,976	-1,025
TIMP1	0,510	0,702	-1,424
IGF2	0,518	0,699	-1,431
MAP3K4	0,800	0,574	-1,741
PLAT	1,293	0,408	-2,450
IRS1	0,805	0,572	-1,747

Androgeenist tingitud ekspressiooni muutus PCOS patsientidel (E2 vs E2+DHT)			
	ddCT	exp rate change	fold change
CTSB	-0,313	1,242	1,242
GLUT4	-1,368	2,580	2,580
IGFBP1	-0,515	1,429	1,429
DKK1	1,765	0,294	-3,399
PRL	-0,125	1,091	1,091
GPX3	-0,135	1,098	1,098
INSR	-1,208	2,309	2,309
STC1	-1,600	3,031	3,031
CCND1	0,115	0,923	-1,083
FOXO1	-0,250	1,189	1,189
DUSP1	-1,248	2,374	2,374
MMP2	-0,300	1,231	1,231
CCL2	0,348	0,786	-1,272
AR	-0,247	1,187	1,187
TIMP1	-0,308	1,238	1,238
IGF2	-0,213	1,159	1,159
MAP3K4	-0,208	1,155	1,155
PLAT	-0,133	1,096	1,096
IRS1	0,332	0,794	-1,259

Androgeenist tingitud ekspressiooni muutus PCOS patsientidel, detsiduaalseeritud rakkudes (E2+P4+cAMP vs E2+P4+DHT+cAMP)			
	ddCT	exp rate change	fold change
CTSB	0,552	0,682	-1,467
GLUT4	3,495	0,089	-11,275
IGFBP1	-1,538	2,903	2,903
DKK1	-2,238	4,716	4,716
PRL	-4,398	21,076	21,076
GPX3	0,053	0,964	-1,037
INSR	0,558	0,679	-1,472
STC1	-1,333	2,518	2,518
CCND1	0,297	0,814	-1,229
FOXO1	-0,482	1,397	1,397
DUSP1	0,372	0,772	-1,295
MMP2	0,095	0,936	-1,068
CCL2	-0,842	1,793	1,793
AR	0,075	0,949	-1,053
TIMP1	1,433	0,370	-2,699
IGF2	-2,338	5,054	5,054
MAP3K4	-0,213	1,159	1,159
PLAT	0,630	0,646	-1,548
IRS1	-0,145	1,106	1,106

LIHTLITSENTS

Mina, Merili Peltser

(sünnikuupäev: 20.05.2018)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Steroidhormoonide mõju geeniekspressioonile endomeetriumi stroomarakkudes polütsüstilise munasarja sündroomiga patsientidel,

mille juhendajad on Marina Suhorutšenko ja Indrek Teino,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2018